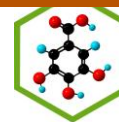


GRUPO POLIFENOLÉS UTP

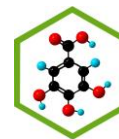


EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)

TRABAJO DE GRADO
Requisito parcial para optar el título de Químico Industrial

Presentado por:
LINA MARCELA GIRALDO VÁSQUEZ

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2011



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)

**Presentado por:
LINA MARCELA GIRALDO VÁSQUEZ**

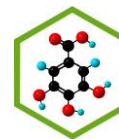
**TRABAJO DE GRADO
Requisito parcial para optar el título de Químico Industrial**

**Directora:
Luz Stella Ramírez Aristizábal Ph. D.**

**Asesora:
Leidy Johanna Tapias Izasa**

Grupo Polifenoles UTP

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2011**



NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)

Presentado por:
LINA MARCELA GIRALDO VÁSQUEZ

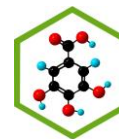
El suscrito director y jurados del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación:

Para la constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy ____ de ____, de ____.

Directora: _____
Nombre: LUZ STELLA RAMÍREZ ARISTIZÁBAL

Jurado: _____
Nombre: OSCAR MARINO MOSQUERA



DEDICATORIA

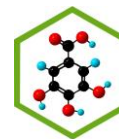
A Papito Dios, Quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo. Y por ser mi fuente de inspiración en mis momentos de angustia, en mis aciertos, mis alegrías y mis tristezas.

A mis padres, Soraya y Oscar, por todo el apoyo brindado, especialmente por sus sabios consejos, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y por enseñarme a luchar por alcanzar mis sueños. Los amo demasiado.

A mi hermanita Daniela por acompañarme en silencio y creer siempre en mí. Te amo locamente.

A mis adorados amigos, “Los del Rincón”, por tantos momentos maravillosos que vivimos juntos, por acompañarme a lo largo de este camino, por estar conmigo siempre que los necesité y por ser una segunda familia para mí, los amo con todo mi corazón.

A Daniel Felipe Escobar, por estar conmigo siempre, por creer en mí y por brindarme su apoyo incondicional.



AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirme alcanzar una meta más en mi vida. Infinitas gracias.

A mi familia por su apoyo incondicional y por alentarme a seguir mis sueños.

A todos los profesores que hicieron de mí una buena Química Industrial y una mejor persona.

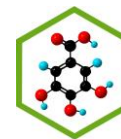
En particular a mi profe y guía Luz Stella Ramírez, quien me orientó en la realización de este trabajo, por sus consejos y su paciencia, ¡Gracias!

Al Profe Oscar Marino Mosquera, por su apoyo y orientación durante el desarrollo del presente trabajo.

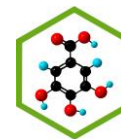
Gracias a mis amigos, Daniel Felipe Escobar, Sandra Milena Bonilla, Angélica Giraldo, Jaime Alejandro Martínez, Omar Eduardo Díaz, Natalia Granada y a todos los que estuvieron siempre conmigo, acompañándome en mis mejores momentos, aguantando mis lapsos de locura y malgenio, por recordarme que soy capaz de alcanzar mis metas. Muchas gracias mis adorados amigos!

Gracias a todas las personas que hicieron posible que culminara mi trabajo, al profe Carlos Humberto, a Vicky, a Germán, a Javier, muchas gracias.

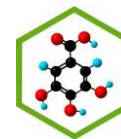
Son muchas las personas a las que les debo agradecer desde el fondo de mi corazón, porque de una u otra manera me acompañaron durante este camino, y me ayudaron a ser la persona que hoy soy.

**TABLA DE CONTENIDO***Página*

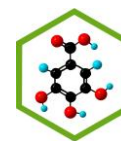
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Surgimiento del problema.	1
1.2. Formulación del problema.	1
1.3. Objetivos	2
1.3.1. Objetivo General	2
1.3.2. Objetivos Específicos	2
1.4. Justificación	2
2. MARCO TEORICO	4
2.1. Estrés oxidativo en la salud humana	4
2.1.1. Especies oxidantes. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres	4
2.2. Sistema antioxidante	8
2.3. Compuestos fenólicos	9
2.3.1. Antocianinas	10
2.3.2. Taninos	13
2.3.3. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos	17
2.4. Métodos para evaluar actividad antioxidante	18
2.4.1. Capacidad de captura del radical libre DPPH	21
2.4.2. Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS•+)	22



2.5. Determinación de Fenoles Totales (Ensayo de Folin-Ciocalteu [FC])	23
2.6. Método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	23
2.7. Descripción de la familia Rubiaceae y del género <i>Palicourea</i>	24
2.7.1. Importancia de la familia Rubiaceae	25
3. SECCIÓN EXPERIMENTAL	26
3.1. Materiales	26
3.1.1. Condiciones instrumentales generales	26
3.1.2. Reactivos empleados	26
3.1.3. Material vegetal	27
3.2. Métodos	27
3.2.1. Extracción de material vegetal	27
3.2.1.1. Obtención del Extracto crudo.	27
3.2.1.2. Extracción Líquido-líquido del extracto crudo (PgMETOH)	29
3.2.1.3. Fraccionamiento Extracto Acuoso (PgAF)	31
3.2.2. Caracterización fitoquímica de compuestos antioxidantes de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i>	32
3.2.2.1. Gradiente de ácido fosfórico e isopropanol	33
3.2.3. Determinación de Fenoles Totales	36
3.2.4. Determinación de la actividad antioxidante	37
3.2.4.1. Capacidad de captura del radical libre DPPH	37
3.2.4.1.1. Determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀)	38
3.2.4.2. Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS•+)	38
3.2.4.2.1. Preparación del radical ABTS •+	38
3.2.4.2.2. Evaluación de la actividad inhibidora del catión radical ABTS •+	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40

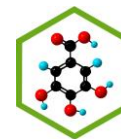


4.1. Caracterización fitoquímica de compuestos antioxidantes de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i>	40
4.2. Fraccionamiento Extracto acuoso (PgAF)	44
4.3. Determinación de Fenoles Totales	46
4.4. Actividad Antioxidante	49
4.4.1. Capacidad de captura del radical libre DPPH	49
4.4.1.1. Controles	49
4.4.1.2. Extractos evaluados por DPPH	51
4.4.1.2.1. Fracciones Extracto PgAF	56
4.4.2. Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS ^{•+})	60
4.4.2.1. Controles	60
4.4.2.2. Extracto PgMETOH	61
4.5. Comparación de los resultados obtenidos a través de los diferentes métodos empleados	66
5. CONCLUSIONES	70
6. RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72



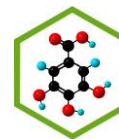
ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
<i>Tabla 1. Antocianinas en la naturaleza con las posiciones de sus grupos sustituyentes^[15]</i>	12
<i>Tabla 2. Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de actividad antioxidante^[19]</i>	20
<i>Tabla 3. Reactivos empleados.</i>	26
<i>Tabla 4. Condiciones cromatográficas del equipo empleadas para la separación con gradiente de los extractos de Palicourea guianensis.</i>	34
<i>Tabla 5. Picos de máxima absorción de los espectros UV de cada extracto.</i>	40
<i>Tabla 6. Tiempos de retención y picos de máxima absorción para cada extracto.</i>	41
<i>Tabla 7. Longitudes de onda características de los compuestos de interés presentes en los extractos.</i>	42
<i>Tabla 8. Resultados de las pruebas de caracterización de los metabolitos secundarios.</i>	43
<i>Tabla 9. Fracciones del extracto acuoso (PgAF) reunidas.</i>	44
<i>Tabla 10. Absorbancia de la curva patrón de Ácido Gálico medida a 760 nm.</i>	47
<i>Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de Fenoles Totales.</i>	48
<i>Tabla 12. %Inhibición del DPPH para control.</i>	50
<i>Tabla 13. Resultados registrados para el extracto PgMETOH en los ensayos con DPPH.</i>	52
<i>Tabla 14. %Inhibición del DPPH para diferentes concentraciones de cada extracto evaluado.</i>	54
<i>Tabla 15. Valores de IC₅₀ obtenidos para cada extracto evaluado.</i>	55
<i>Tabla 16. Resultados obtenidos para los ensayos de las fracciones del extracto PgAF.</i>	56
<i>Tabla 17. Valores de IC₅₀ obtenidos para cada fracción del extracto PgAF evaluada.</i>	58
<i>Tabla 18. %Inhibición del ABTS para cada control.</i>	60
<i>Tabla 19. Resultados registrados para el extracto PgMETOH en los ensayos con ABTS.</i>	62
<i>Tabla 20. %Inhibición del ABTS para diferentes concentraciones de cada extracto evaluado.</i>	63
<i>Tabla 21. Valores de IC₅₀ obtenidos para cada extracto evaluado por ABTS.</i>	64
<i>Tabla 22. Resultados obtenidos para cada ensayo realizado a los extractos evaluados.</i>	66

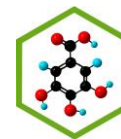


ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<i>Figura 1. Daños producidos por los Radicales Libres^[10]</i>	6
<i>Figura 2. Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes^[10]</i>	7
<i>Figura 3. Mecanismo de actuación y estabilidad del radical aroxilo^[13]</i>	10
<i>Figura 4. Estructura básica de la antocianina^[14]</i>	12
<i>Figura 5. Estructura química base de monómeros de taninos^[17]</i>	15
<i>Figura 6. Esquema de Reacción del DPPH^[21]</i>	21
<i>Figura 7. Esquema de reacción del ABTS</i>	22
<i>Figura 8. Esquema de la extracción inicial del material vegetal</i>	28
<i>Figura 9. Esquema de la extracción líquido-líquido a partir del extracto metanólico</i>	30
<i>Figura 10. Fraccionamiento del Extracto PgAF</i>	32
<i>Figura 11. Placa cromatográfica en fase normal de los extractos, I. Visible, II. Onda corta</i>	33
<i>Figura 12. Placa cromatográfica en fase reversa de los extractos, I. Onda corta, II. Onda larga</i>	33
<i>Figura 13. Variación en el tiempo de la proporción de los solventes A (ácido fosfórico 0,05%) y B (isopropanol) para el método cromatográfico empleado</i>	34
<i>Figura 14. I. Cromatograma de PgAF-6, II. UV (TR 6,54 min), III. UV (TR 7,34 nm), IV. UV (TR 8,16 min), V. UV (TR 8,96 min), VI. Cromatograma de PgAF-7, VII. UV (TR 6,52 min), VIII. UV (TR 8,35 min), IX. UV (TR 9,02 min), X. UV (TR 10,12)</i>	46
<i>Figura 15. Curva patrón de Ácido Gálico</i>	47
<i>Figura 16. %Inhibición del DPPH Vs Concentración de Ácido Ascórbico</i>	50
<i>Figura 17. %Inhibición del DPPH Vs Concentración Ácido Gálico</i>	51
<i>Figura 18. %Inhibición del DPPH Vs Concentración Extracto PgMETOH</i>	54
<i>Figura 19. %Inhibición del ABTS Vs Concentración de Ácido Ascórbico</i>	61
<i>Figura 20. %Inhibición del ABTS Vs Concentración Ácido Gálico</i>	61
<i>Figura 21. %Inhibición del ABTS Vs Concentración Extracto PgMETOH</i>	64

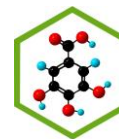


<i>Figura 22. %Inhibición DPPH Vs Concentración Fenoles Totales y %Inhibición ABTS Vs Concentración de Fenoles Totales.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 23. %Inhibición DPPH Vs %Inhibición ABTS (1000ppm).</i>	<i>68</i>
<i>Figura 24. %Inhibición DPPH Vs %Inhibición ABTS (1500ppm).</i>	<i>68</i>
<i>Figura 25. %Inhibición DPPH Vs %Inhibición ABTS (2000ppm).</i>	<i>68</i>

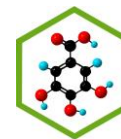


ÍNDICE DE ANEXOS

	<i>Página</i>
<i>Anexo 1. Espectro UV para el extracto PgMETOH.....</i>	<i>77</i>
<i>Anexo 2. Espectro UV del Extracto PgHF.....</i>	<i>77</i>
<i>Anexo 3. Espectro UV de PgDF.....</i>	<i>77</i>
<i>Anexo 4. Espectro UV de PgAEF.....</i>	<i>78</i>
<i>Anexo 5. Espectro UV de PgAF.....</i>	<i>78</i>
<i>Anexo 6. Cromatograma HPLC del extracto PgMETOH.....</i>	<i>79</i>
<i>Anexo 7. Cromatograma HPLC del extracto PgAEF.....</i>	<i>80</i>
<i>Anexo 8. Cromatograma HPLC del extracto PgAF.....</i>	<i>81</i>
<i>Anexo 9. Cromatograma GC del extraco PgHF.....</i>	<i>82</i>
<i>Anexo 10. Cromatograma GC del extracto PgDF.....</i>	<i>83</i>
<i>Anexo 11. I. Cromatograma fracciones PgAF-6+7, II. UV (TR 6,52 min), III. UV (TR 7,34 min), IV. UV (TR 8,16 min), V. UV (TR 8,35 min), VI. UV (TR 8,96 min), VII. UV (TR 9,02 min), VIII. UV (TR 10,12 min).....</i>	<i>83</i>
<i>Anexo 12. I. Cromatograma PgAF-8, II. UV (TR 6,43 min), III. UV (TR 7,63 min), IV. UV (TR 8,20 min), V. UV (TR 9,00 min).....</i>	<i>84</i>
<i>Anexo 13. I. Cromatograma PgAF-9, II. UV (TR 3,95 min), III. UV (TR 7,19 min), IV. UV (TR 8,11 min) VIII. UV (TR 9,39 min).....</i>	<i>85</i>
<i>Anexo 14. I. Cromatograma fracciones PgAF-10-13, II. UV (TR 6,49 min), III. UV (TR 8,25 min), IV. UV (TR 8,70 min), V. UV (TR 8,79 min), VI. UV (TR 9,04 min).....</i>	<i>86</i>
<i>Anexo 15. I. Cromatograma fracciones PgAF-14+15, II. UV (TR 6,41 min), III. UV (TR 8,27 min), IV. UV (TR 8,39 min), V. UV (TR 9,05 min).....</i>	<i>87</i>
<i>Anexo 16. I. Cromatograma Fracciones PgAF-16+17, II. UV (TR 8,20 min), III. UV (TR 8,35 min), IV. UV (TR 9,03 min), V. UV (TR 10,07 min).....</i>	<i>88</i>
<i>Anexo 17. I. Cromatograma PgAF-18, II. UV (TR 8,19 min), III. UV (TR 8,31 min), IV. UV (TR 9,00 min), V. UV (TR 10,03 min).....</i>	<i>89</i>
<i>Anexo 18. I. Cromatograma PgAF-19, II. UV (TR 8,18 min), III. UV (TR 8,32 min), IV. UV (TR 9,01 min), V. UV (TR 10,00 min).....</i>	<i>90</i>



<i>Anexo 19. I. Cromatograma PgAF-20, II. UV (TR 8,06 min), III. UV (TR 9,25 min).....</i>	<i>91</i>
<i>Anexo 20. I. Cromatograma PgAF-21, II. UV (TR 10,11 min), III. UV (TR 15,31 min).....</i>	<i>92</i>
<i>Anexo 21. I. Cromatograma fracciones PgAF-22-27, II. UV (TR 10,12 min).</i>	<i>93</i>
<i>Anexo 22. I. Cromatograma PgAF-28, II. UV (TR 10,09 min), III. UV (TR 15,90 min).....</i>	<i>94</i>
<i>Anexo 23. I. Cromatograma PgAF-29, II. UV (TR 8,49 min), III. UV (TR 10,12 min), IV. UV (TR 15,97 min).....</i>	<i>95</i>
<i>Anexo 24. I. Cromatograma PgAF-30+31, II. UV (TR 10,17 min).....</i>	<i>96</i>
<i>Anexo 25. I. Cromatograma PgAF-32-34, II. UV (TR 10,14 min), III. UV (15,89 min), IV. (TR 14,86 min).</i>	<i>97</i>
<i>Anexo 26. Cromatograma PgAF-35, II. UV (TR 10,26 min), III. UV (TR 15,93 min).</i>	<i>98</i>
<i>Anexo 27. I. Cromatograma PgAF-36-44, II. UV (TR 10,21 min), III. UV (TR 18,53 min), IV. UV (TR 19,42 min). .</i>	<i>99</i>

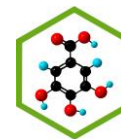


RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante de la planta *Palicourea guianensis* (Rubiaceae), para lo cual se realizó la extracción de la parte aérea de dicha especie con metanol como solvente principal, posterior a esto, se fraccionó el extracto crudo con los siguientes solventes: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua. A los diferentes extractos obtenidos se les realizó una caracterización fitoquímica por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) comparando longitudes de onda de máxima absorción de los extractos con longitudes de onda características encontradas en la literatura con el propósito de determinar la presencia de compuestos tales como fenoles, taninos y antocianinas, los cuales están generalmente relacionados con la actividad antioxidante evaluada. Adicional a esto, se llevó a cabo la determinación de fenoles totales presentes en los extractos obtenidos para así adquirir más información acerca de la posible actividad antioxidante de cada uno de ellos.

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo a través de los métodos de captura de electrones DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico); teniendo como control positivo soluciones de ácido ascórbico y ácido gálico a 50, 100 y 150 ppm. Posterior a esto se determinó la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de los extractos promisorios. Obteniendo que el extracto en acetato de etilo (PgAEF) y el extracto acuoso (PgAF) fueron los más promisorios para la actividad evaluada, con un IC₅₀ de 5207 ppm, y 3912 ppm respectivamente. La capacidad antioxidante obtenida por ambos métodos de captura de electrones esta correlacionada con la concentración de fenoles totales presentes en los extractos evaluados.

PALABRAS CLAVES: DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, fenoles, flavonoides, taninos, antocianinas.

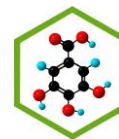


ABSTRACT

In this study was evaluated the antioxidant activity of plant *Palicourea guianensis* (Rubiaceae), for which extraction was done by the aerial part of the species with methanol as the primary solvent, after this, the crude extract was fractionated with the following solvents: n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water. A different extracts obtained were subjected to phytochemical characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) comparing wavelengths of maximum absorption of the extracts with characteristic wavelengths found in the literature in order to determine the presence of compounds such as phenols, tannins and anthocyanins, which are generally associated with antioxidant activity evaluated. In addition to this, the determination of total phenols present in the extracts obtained was carried out in order to acquire more information about the possible antioxidant activity of each of them.

The antioxidant activity evaluation was carried out through the electron capture methods DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhidracilo) and ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) and ABTS, taking as a positive control ascorbic acid solutions and gallic acid at 50, 100 and 150 ppm. This was determined after half inhibitory concentration (IC_{50}) of the extracts promising. Getting the extract in ethyl acetate (PgAEF) and the aqueous extract (PgAF) were the most promising for the assessed activity with an IC_{50} of 5207 ppm and 3912 ppm respectively. Antioxidant capacity obtained by both methods of electron capture is correlated with the concentration of total phenols present in the extracts tested.

KEY WORDS: DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, phenols, flavonoids, tannins, anthocyanins.



1. ANTECEDENTES

1.1. Surgimiento del problema.

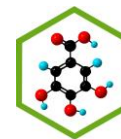
En las últimas décadas se han logrado significativos avances para obtener sustancias químicas o biológicas que sean menos tóxicas para el ambiente, para el hombre y que al mismo tiempo, sean más selectivas respecto a los propósitos que persiguen, bien sea como antioxidantes, como reguladores en el crecimiento de otras especies, eliminando microorganismos, etc.

Uno de esos propósitos mencionados y el cual es motivo de estudio para este trabajo, es encontrar formas naturales de prevenir la proliferación de radicales libres en el cuerpo humano, ya que se ha demostrado que dichos radicales libres pueden inducir daños oxidativos a las biomoléculas y estos daños pueden causar diversas anomalías en el organismo, como arterosclerosis, envejecimiento, cáncer^[1] e incluso pueden llegar a provocar daño a nivel celular. Es por esto que se ha despertado un gran interés por la obtención de productos de origen natural que contribuya al desarrollo de nuevos antioxidantes, que permitan combatir la proliferación de radicales libres en el organismo y que al mismo tiempo sean amigables con el medio ambiente.

1.2. Formulación del problema.

¿Presentarán actividad antioxidante los extractos en *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua, obtenidos a partir de *Palicourea guianensis*?

Para dar una respuesta parcial a éste problema, la investigación está guiada por lo siguientes objetivos:



1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

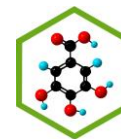
Evaluar la actividad antioxidante en extractos de la parte aérea de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae).

1.3.2. Objetivos Específicos

- Obtener mediante extracción por ultrasonido el extracto metanólico a partir de la parte aérea de *Palicourea guianensis*.
- Realizar extracción líquido-líquido con: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua a partir del extracto metanólico.
- Caracterizar fitoquímicamente fenoles, taninos y antocianinas presentes en los diferentes extractos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
- Determinar la actividad antioxidante en los diferentes extractos a través de los métodos de captura de electrones DPPH y ABTS.

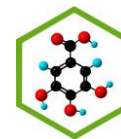
1.4. Justificación

Las plantas siempre han sido de vital importancia para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda y vestido, e incluso en actos rituales. El uso de las plantas como alternativa medicinal es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana^[2]; ya que ofrecen grandes aportes a la salud del hombre, actuando por ejemplo como antioxidantes. Es por esto que se evalúan extractos obtenidos a partir de plantas, proceso que ha venido despertando cada vez más interés, debido al incremento en los quebrantos en la salud humana, ocasionados por el uso



de productos sintéticos, elaborados a partir de sustancias químicas nocivas no solo para el hombre sino también para el medio ambiente.

Esto ha hecho que se intensifique la búsqueda y obtención de compuestos de origen natural que permitan encontrar nuevas sustancias más efectivas como alternativas en el control de los radicales libres presentes en el cuerpo humano. Por este motivo se desarrolla este estudio, centrado en la investigación de la planta *Palicourea guianensis*; la cual se encuentra desde México a Colombia, Venezuela, Brazil, Bolivia y Las Antillas^[3]. Esta pertenece a la familia Rubiaceae, del género *Palicourea*. Colombia es el país con mayor número de especies de este género con cerca de 130, presentes en todas las regiones y altitudes hasta las zonas de páramo; su mayor diversificación se localiza en la región Andina entre los 1.000 y 2.000 m de altitud^[4]. Con el estudio de esta especie se espera dar aportes al conocimiento científico, dado que tanto la familia Rubiaceae, como el género *Palicourea*, presentan antecedentes en diferentes actividades biológicas, como actividades antimicrobiana y antimicótica^[5, 6].



2. MARCO TEORICO

2.1. Estrés oxidativo en la salud humana

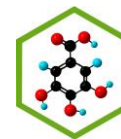
El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN^[7].

Pese a esto, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ERO. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento^[7].

2.1.1. Especies oxidantes. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de óxido-reducción. El término Especies Reactivas del Oxígeno es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O₃, ONOO⁻, H₂O₂^[7].

El mecanismo por el que los radicales libres producen sus efectos transcurre mediante una reacción radicalaria, en la que se forman especies reactivas oxigenadas, que son los que producen los efectos nocivos. Este proceso se ve favorecido por la presencia de oxígeno y de luz ultravioleta, que inicia la formación de radicales libres^[8].



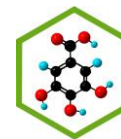
Las especies reactivas del oxígeno (ERO), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad^[9].

Las ERO producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular. Actúan sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL); sobre los glúcidos, alterando las funciones celulares tales como las asociadas con la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores; sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización; sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis^[9].

En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia de neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento, entre otros. Además, un creciente número de estudios soportan la teoría que el estrés oxidativo está envuelto en la progresión de VIH^[9].

Los radicales libres (RL), son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, y debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos, y es precisamente esa reactividad la causante de su alta toxicidad y de su corta vida media. Es importante mencionar que no siempre la presencia de radicales libres se relaciona con la toxicidad, dado que a concentraciones fisiológicas, los radicales libres pueden actuar como mediadores o reguladores, pero al superar estas concentraciones se vuelven potentes oxidantes citotóxicos^[10].

En los seres vivos se generan muchos tipos de radicales libres, entre estos los de oxígeno, por lo que se utiliza el término de Especies Reactivas del Oxígeno (Reactive Oxygen Species ROS), para referirse a especies derivadas del oxígeno, sean radicales o no radicales, como agentes



oxidantes. De igual forma existen especies reactivas del nitrógeno (ERN), del cloro (ERCl) y del bromo (ERBr)^[10].

El organismo de los seres vivos está constantemente expuesto a una gran variedad de ERO y ERN, que se pueden generar de manera exógena, a partir de tabaco, radiaciones UV, aireación contaminada, o de manera endógena, relacionada con el metabolismo del oxígeno, y con las diversas reacciones de defensa del sistema inmunitario, dándose de manera continua dentro de las células a lo largo de la vida del ser vivo^[10]. Cuando la concentración de radicales libres en el organismo es demasiado alta, las estructuras biológicas que conforman el organismo, como DNA, RNA, proteínas, carbohidratos y lípidos, se pueden ver alteradas, perdiendo parte de sus funciones, incrementando la permeabilidad celular, y en ocasiones puede causar muerte celular por necrosis, entre otros daños como se puede observar en la **Figura 1**^[10]. Es por esto que es tan importante el estudio de los mencionados radicales libres, y la búsqueda de antioxidantes que puedan evitar los daños anteriormente indicados^[10].

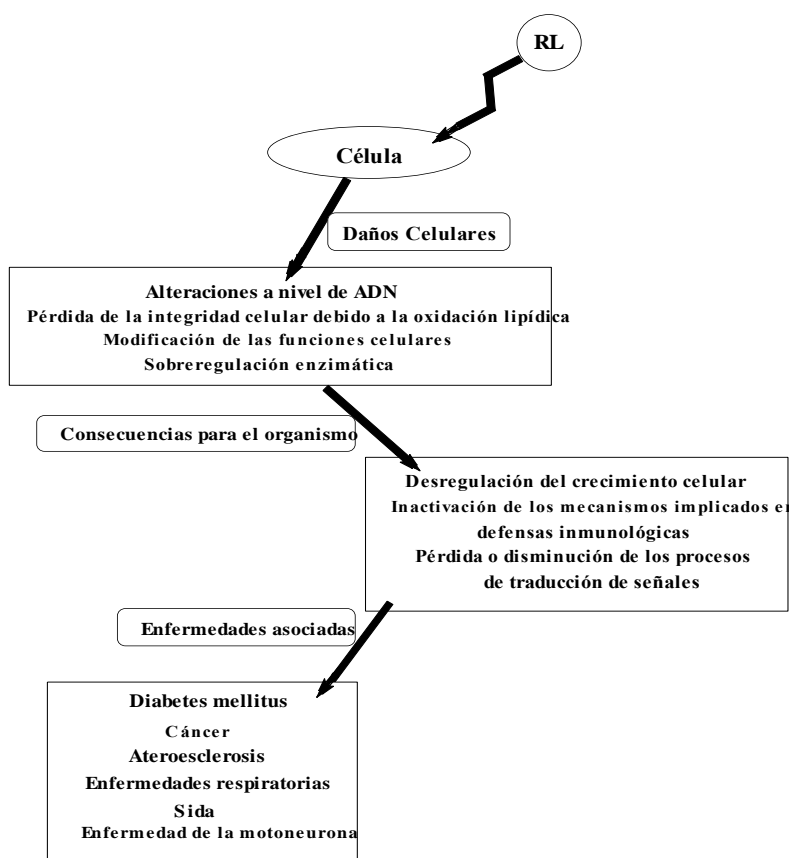
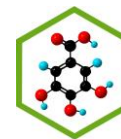


Figura 1. Daños producidos por los Radicales Libres^[10].



Para encontrar formas de contrarrestar los daños causados por los radicales libres es necesario entender el mecanismo por medio del cual estos actúan sobre las estructuras biológicas, en donde el RL sustrae un electrón de la biomolécula, dejándola en su estado oxidado^[10]. Así como los RL presentan un mecanismo de acción, los antioxidantes presentan también su mecanismo de acción sobre dichos RL, como se puede observar en la **Figura 2**^[10].

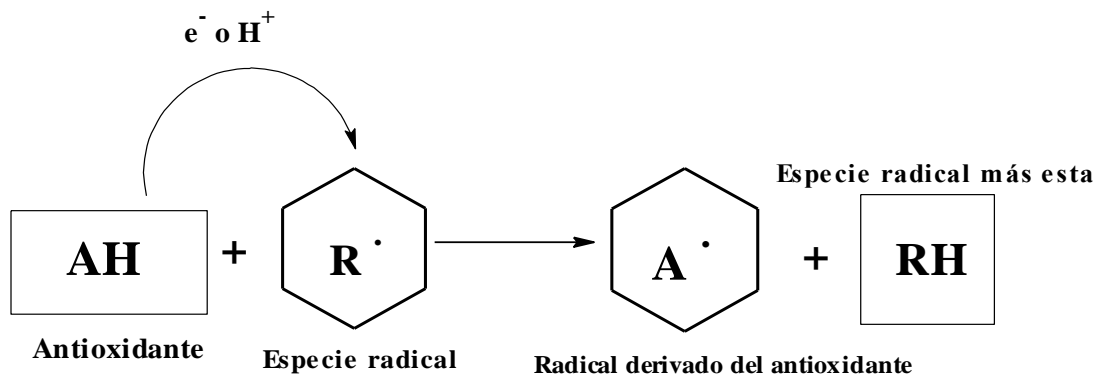
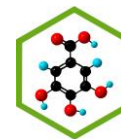


Figura 2. Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes^[10].

Como se ha dicho, es de vital importancia encontrar sustancias que puedan actuar como antioxidantes, por lo que se hace necesario implementar ensayos de evaluación de la capacidad secuestradora de RL, que permitan determinar que sustancia puede presentar actividad antioxidante frente a otra. Entre estos ensayos, se encuentra el método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil), que se basa en la reducción del radical por captación de un átomo de hidrógeno al añadir el antioxidante. Este método se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos^[10].

La utilización de antioxidantes permite contrarrestar las especies reactivas oxigenadas, de forma que se impiden las consecuencias de su actividad. Estos antioxidantes actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres. Impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrógeno de forma que se neutralizan los radicales libres^[8].

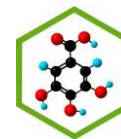


Con el fin de encontrar antioxidantes, se emplean métodos de medición de la actividad antioxidante que muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete y fuentes de radicales libres. La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación^[9].

2.2. Sistema antioxidante

Como respuesta a la permanente producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que dañan estructuras biológicas, el organismo atenúa estos efectos por medio de la acción de sistemas antioxidantes. Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en pequeñas concentraciones en comparación a un sustrato oxidable, que retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato, y también estabiliza las ERO mediante la cesión de un protón (H^+) y las convierte en compuestos no radicalarios. Otras definiciones hablan de antioxidante como cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones comparada a las de un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato y protege a los sistemas biológicos frente a efectos potencialmente perjudiciales tanto de procesos como reacciones que causan excesivas oxidaciones^[11].

Existen diferentes sistemas de defensa antioxidante en el organismo. Uno de ellos está conformado por sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, siendo éstas la primera defensa contra los radicales libres, que actúan neutralizando a estas especies altamente reactivas en moléculas menos dañinas para la célula. Otros sistemas, no enzimáticos, están conformados por compuestos como carotenoides, glutatión reducido y las vitaminas C y E que estabilizan las ERO o también que provocan la quelación de iones metálicos



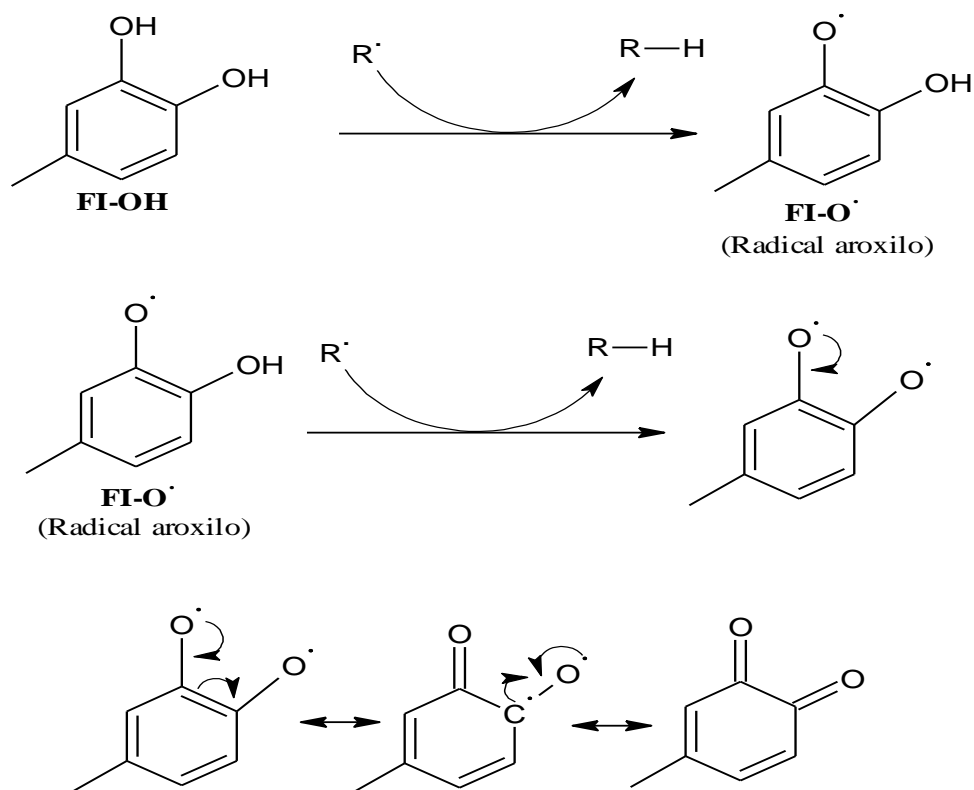
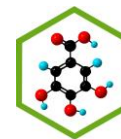
de elementos de transición como hierro y cobre, que al estar en estado reducido potencian su autooxidación y generación de anión superóxido^[11].

Los antioxidantes aportados por la dieta disminuyen los efectos de las EROs. Son variados los alimentos que están constituidos por estas sustancias y cada vez más utilizados por las personas tanto por medio del consumo directo de vegetales y frutas que los incluyen, como también por medio del uso de fármacos. Es por esto que la dieta juega un papel muy importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años^[11].

2.3. Compuestos fenólicos

Compuestos orgánicos que estructuralmente presentan un grupo -OH unido a un anillo aromático, se conocen como compuestos fenólicos y aquellos en que se repite este radical son conocidos como polifenoles. Los compuestos de esta familia presentan variados efectos beneficiosos para la salud: prevención contra cáncer, propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales, antimicrobianas, vasorelajantes y antioxidantes. Entre sus acciones antioxidantes encontramos la inhibición de la formación de ERO por medio de la inhibición de enzimas productoras de ERO como la xantina oxidasa, o la quelación de los elementos traza involucrados en la producción de los mismos; el atrapamiento directo de ERO y el up-regulation de los sistemas antioxidantes endógenos^[11].

Los polifenoles estabilizan las ERO al capturarlas formando el radical aroxilo (FI-O·), para luego reaccionar con un segundo radical, con lo cual adquieren una estructura quinona estable^[12] como se observa en la **Figura 3**.

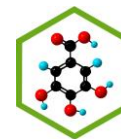


Estructura quinona estable por resonancia

Figura 3. Mecanismo de actuación y estabilidad del radical aroxilo^[13].

2.3.1. Antocianinas

Dentro de este grupo de compuestos se encuentran las antocianinas, que se diferencian de otros polifenoles por poseer azúcares dentro de sus grupos funcionales y, en su mayoría, presentar varios grupos -OH. Las diferencias individuales entre los antocianinas dependen del número de grupos hidroxilo, la naturaleza y número de azúcares que están unidos a la molécula, a la posición de esa unión y la naturaleza y número de ácidos aromáticos unidos al azúcar en la molécula^[11]. Las antocianinas (del griego anthos flor y kyanos azul), son el grupo más importante, de pigmentos solubles al agua visibles para el ojo humano. Las antocianinas forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos. Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos^[11].



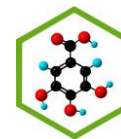
Las antocianinas se localizan principalmente en la piel de frutas como manzanas, peras, uvas, zarzamoras, ciruelas, de flores como la Jamaica, rosas y verduras como col morada y maíz morado. La función que cumplen es la de atraer seres vivos (principalmente insectos y pájaros) para propósitos de polinización y dispersión de semillas. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas. Existen factores adicionales que afectan el color como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, etc^[11].

Al igual que otras sustancias polifenólicas, las antocianinas se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas, a las cuales se les une un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico. Se trata de flavonoides, es decir, sustancias derivadas del núcleo flavano, con un anillo-A benzoil y un anillo-B hidroxicinamoil.

La estructura de la antocianina es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de flavilio. Cuando el residuo de azúcar es un hidrolizado de la antocianina, el resultado es la aglicona, conocida como se mencionó anteriormente como antocianidina. Las más comunes formas de antocianidinas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina y petunidina.

Las clases comunes de glucósidos son: 3-monósido, 3-biócido y 3-triócido, así como también 3,5-diglicósido y más raramente el 3,7-diglicósido con glucosa, galactosa, arabinosa (es uno de los más frecuentes) y xilosa. Las antocianinas poseen uniones de azúcar en el anillo-B 3' y 5'-hidroxilos. Los dos tipos más importantes de glucósidos son: el 3-monósidos y el 3-4-diglicósido. Como regla el 3-hidroxil siempre tiene un azúcar, exceptuando 3- desoxipelargonidina, 3-desoxicianidina y 3-desoxidelfina^[11].

Además de la glucosilación, la introducción de moléculas aciladas es un efecto que ocurre ampliamente. Los grupos comunes de acilo son los ácidos aromáticos de los cuales los más comúnmente encontrados son ácidos hidroxicinámicos: p-coumárico, cafeico y ferúlico, y más raramente el hidroxibenzoico. El color particular de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la metoxilación produce un color rojo^[11].



La estructura de las antocianinas está formada por dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos ($C_6C_3C_6$), como se muestra en la **Figura 4**. Las antocianinas se encuentran en la naturaleza como glicósidos y sus agliconas se denominan antocianidinas.

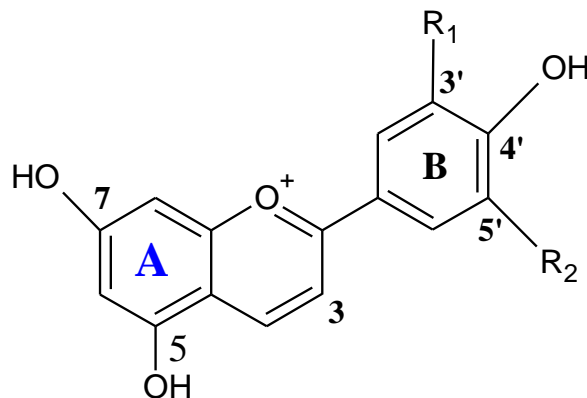
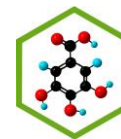


Figura 4. Estructura básica de la antocianina^[14].

Todas las antocianinas son derivadas del catión flavilo básico. Se conocen más de 100, las diferencias entre ellas se debe al número de grupos hidróxilos, el grado de metoxilación de éstos grupos, así como la naturaleza y el número de los ácidos aromáticos y alifáticos presentes en la molécula^[11]. Existen distintos tipos de antocianinas en la naturaleza, sus grupos sustituyentes se encuentran en distintas posiciones como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Antocianinas en la naturaleza con las posiciones de sus grupos sustituyentes^[15].

Antocianina	Carbono					
	3	5	6	7	3'	5'
Apigenidina	H	OH	H	OH	H	H
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	H
Tricitinidina	H	OH	H	OH	OH	OH
Pelargonidina	OH	OH	OH	OH	H	H
Aurantidinidina	OH	OH	H	OH	H	H
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	H

Continuación de la **Tabla 1**

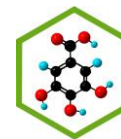
Antocianina	Carbono					
	3	5	6	7	3'	5'
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	H
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	H
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Pulchelinidina	OH	OMe	H	OH	OH	H
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe
Hirsutinidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe

De todas las antocianinas existentes, sólo seis son de interés en los alimentos: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina^[11]. Los restantes son menos frecuentes y se encuentran en algunas hojas. Es común que una misma antocianidina interaccione con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas; la pelargonidina es la que produce el color rojo escarlata de algunas flores y de las fresas; la delfinidina se encuentra en las berenjenas y la cianidina en col roja, higos, cerezas, ciruelas, y otros frutos^[11].

2.3.2. Taninos

El término tanino se acuñó históricamente por el uso empírico que se daba a algunos extractos vegetales para el proceso de tanaje o conversión de las pieles de animales en cuero desde hace más de 100 años. El desarrollo de las modernas técnicas instrumentales para la elucidación estructural de sustancias orgánicas, permitió el inicio científico en el área de polifenoles vegetales, término sugerido por el doctor Edwin Haslam en lugar de taninos^[16].

El proceso de conversión de las pieles animales en cueros durables utilizando extractos de plantas en regiones mediterráneas data de al menos 2000 años atrás. Este proceso se conoce como curtiembre (tanning), con lo cual se popularizó y estableció el uso del término “tanino” en la literatura científica. Hace más de 100 años atrás, Trimble comentó: “Los taninos ocupan una



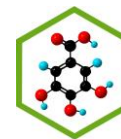
parte de la línea fronteriza en ciencias entre la botánica y la química”. Aunque la importancia de los taninos vegetales en diversas disciplinas científicas ha sido reconocida, no es fácil dar una definición firme. Probablemente la definición más simple, concisa y aceptable sigue siendo la de Bate-Smith y Swain (1962): “ Compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000 uma, que además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen propiedades especiales tales como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas.”^[16].

Muchos aun prefieren el término taninos vegetales, simplemente debido a su falta de precisión. Sin embargo, terminológica y científicamente, se recomienda el término “polifenoles vegetales” como descriptor para estos metabolitos secundarios de plantas superiores, si se quieren interpretar seriamente sus diversas características y aplicaciones a nivel molecular^[16].

Ahora es posible describir en términos amplios la naturaleza de los polifenoles vegetales. Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en varios sectores del reino de las plantas superiores, especialmente en las familias Leguminosae, Rosaceae, Polygonaceae, Fagaceae, Rhyzophoraceae, Myrtaceae y Melastomataceae^[16].

Se distinguen por las siguientes cinco características generales:

- i) solubilidad en agua
- ii) masa molecular entre 500 y 3000-5000 uma
- iii) estructura y carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos para cada 1000 unidades de masa molecular relativa)
- iv) complejación intermolecular (astringencia)
- v) características estructurales (dos motivos estructurales mayores, proantocianidinas o taninos condensados y taninos hidrolizables, más un tercer grupo minoritario, los florotaninos)^[16]. Los tres grupos estructurales se producen por tres vías biosintéticas diferentes. Los taninos hidrolizables se producen por una derivación de la vía del ácido shikímico que conduce a la producción de ácido gálico (unidad monomérica fundamental), los florotaninos derivan por la vía de la malonilCoA que produce el bloque de construcción floroglucinol; mientras los taninos



condensados derivan por biosíntesis mixta de las dos rutas anteriores que producen flavan-3,4-dioles (unidades monoméricas) que luego polimerizan por condensación^[16].

En la **Figura 5** se muestra la estructura básica de algunos monómeros de los taninos.

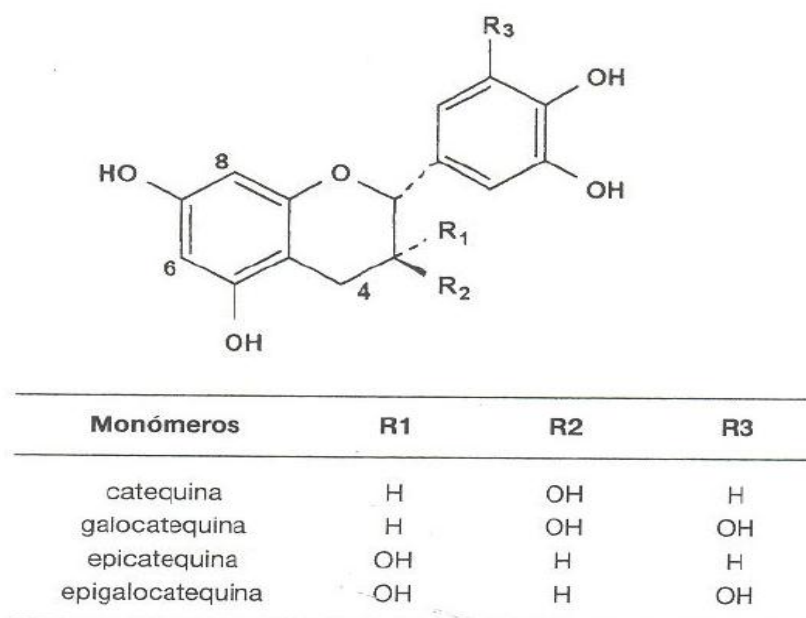
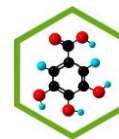


Figura 5. Estructura química base de monómeros de taninos^[17].

La fórmula $C_{14}H_{14}O_{11}$, considerada en algunas bibliografías como tanino común, es sólo aproximada, ya que son polímeros complejos. Existen dos categorías de taninos, clasificados en base a su vía de biosíntesis y sus propiedades químicas: los taninos condensados y los taninos hidrolizables^[18].

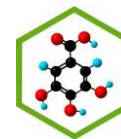
Los taninos condensados (proantocianidinas): polímeros de varios núcleos flavan-3-ol. Se hidrolizan por hidrólisis enzimática y son resistentes a la hidrólisis ácida obteniendo como productos: antocianidinas y flobáfenos. Se encuentran preferentemente en plantas leñosas^[18].

Los taninos hidrolizables: polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico y azúcares simples. Son más pequeños que los taninos condensados, porque la mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3000. Se hidrolizan tanto por hidrólisis ácida o básica como por hidrólisis enzimática^[18].



Los taninos proporcionan a las plantas medicinales las siguientes propiedades^[18]:

- **Cicatrizante y antihemostático:** Los taninos cumplen una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas y hemostática, al detener el sangrado. La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio "seco" que impide el desarrollo de las bacterias. Al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre, y por tanto contribuyen a la curación de las heridas.
- **Antidiarreico:** Por su acción astringente, (que contrae los tejidos y seca las secreciones) resultan eficaces en el tratamiento de la diarrea, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas.
- **Antioxidantes:** Los taninos se consideran antioxidantes por su capacidad para eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer.
- **Antibacterianas:** La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse.
- **Inhibidor enzimático:** Los taninos son inhibidores enzimáticos: bloqueo de la 5-lipoxigenasa (geraniína, corilagina); inhiben la enzima convertidora de angiotensina, activan la hialuronidasa, las glucosiltransferasas de los microorganismos implicados en la cariogénesis; los taninos elágicos y los taninos complejos inhiben la proteinkinasa C, etc.
- **Antídotos de venenos:** La capacidad que tienen estos principios de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo es aprovechada, en caso de ingestión de productos venenosos, para impedir que los venenos entren en la corriente sanguínea. El ácido tánico se utiliza como contraveneno para precipitar las sustancias venenosas de los alcaloides y ciertas sales metálicas. Aunque la utilización de este componente por vía interna pueda producir síntomas gastrointestinales desagradables, su acción positiva en la neutralización de los venenos justifica su uso.
- **Hipocolesterolémico:** Los taninos reducen el colesterol al inhibir su absorción y expulsarlo a través de las heces. Se ha comprobado como la ingestión de plantas ricas en este componente como la uva o el aceite de oliva ha supuesto una reducción de los niveles de colesterol "malo" (LDL) y triglicéridos y un aumento de "colesterol bueno" (HDL)^[18].



2.3.3. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

Los antioxidantes en forma general son flavonoides o compuestos fenólicos que están presentes en diferentes extractos vegetales. Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado^[18].

Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas^[18].

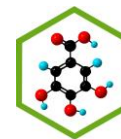
Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales:

i) Como captadores de radicales libres

Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres. El radical fenoxilo generado es menos reactivo dado que se estabiliza por resonancia con los electrones “p” del anillo aromático.

ii) Como quelantes de metales

Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton^[7].



Sin embargo existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de grupos hidroxilo, la presencia de azúcares unidos y el grado de polimerización determinarán propiedades de los compuestos fenólicos tales como la solubilidad y la tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno. El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros^[7].

Adicionalmente, compuestos fenólicos como los tocoferoles, tocotrienoles y flavonoides presentan una alta capacidad de capturar radicales, por lo que en muchas ocasiones resulta de gran utilidad la evaluación del contenido total de fenoles, ya que de esta forma se podría determinar la relación entre esta y el IC₅₀^[18].

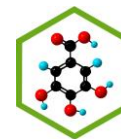
2.4. Métodos para evaluar actividad antioxidante

Los métodos de determinación de la actividad antioxidantes se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo^[19].

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción^[19].

Los métodos *in vitro* son útiles para comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras de alimentos. Los resultados son limitados desde un punto de vista nutricional, ya que no reproducen la situación fisiológica. Para alcanzar una mayor aproximación algunos ensayos incluyen radicales relevantes en los sistemas biológicos (O₂, H₂O₂, ROO, OH)^[19].

Por otra parte, la actividad antioxidante de un alimento *in vitro* difiere de su efecto antioxidante *in vivo*, ya que las transformaciones metabólicas que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo modifican su actividad. Ciertos compuestos fenólicos poliméricos que presentan una



baja actividad *in vitro* pueden, sin embargo, contribuir a la capacidad antioxidante del plasma después de su transformación metabólica en compuestos más simples. Así, dos muestras de té verde y negro, que daban resultados muy diferentes en experiencias *in vitro*, produjeron, tras su consumo, un incremento similar en la capacidad antioxidante del plasma^[19]. Por ello es importante tener en consideración aspectos como el grado de absorción de los compuestos, los productos del metabolismo que generan y la actividad de los mismos^[19].

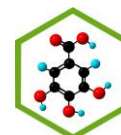
Las medidas *in vivo* pueden reflejar las posibles interacciones entre los distintos componentes de la dieta. Sin embargo, existen numerosos aspectos aún desconocidos en las medidas *in vivo*, como el modo de acción de los radicales dentro de los compartimentos celulares y si los compuestos antioxidantes se transportan al interior de los mismos^[19].

En la **Tabla 2** se resumen las características más relevantes de los métodos de medida de actividad antioxidante que han sido usados con mayor frecuencia^[19].

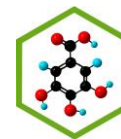
Con base a las reacciones químicas involucradas, pueden dividirse en dos categorías: ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones. Los métodos de transferencia de un átomo de hidrógeno están basados en reacciones donde el antioxidante y el sustrato compiten por el radical libre sintético, una molécula oxidable y un antioxidante. Los métodos basados en la transferencia de un electrón involucran una reacción de oxidación con el antioxidante que es un indicador del punto final de la misma^[7].

Las condiciones para el empleo de los métodos de transferencia de electrón como ABTS y DPPH, pueden variar de alguna u otra forma, (por ejemplo pH, solventes y longitud de onda a la que se mide), dando diferentes resultados. Sin embargo son muy útiles para evaluar la actividad antioxidante de sustancias y alimentos que los contienen. Estos métodos pueden servir para evaluar si un proceso de elaboración de un alimento influye sobre la actividad antioxidante, además puede ser un indicativo del potencial antioxidante para su consumo^[7].

Para evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos en el presente trabajo, se usaron dos métodos de captura de electrones, DPPH y ABTS, que se explican a continuación.

**Tabla 2.** Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de actividad antioxidante^[19].

<u>Características</u>	<i>Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno</i>				<i>Ensayos de transferencia de electrones</i>			<i>Otros ensayos</i>		
	<i>TRAP</i>	<i>ORAC</i>	<i>DCFH-DA</i>	<i>Ensayo Crocina</i>	<i>DPPH</i>	<i>ABTS</i>	<i>FAP</i>	<i>Voltametría cíclica</i>	<i>Ensayo Luminol</i>	<i>TOSC</i>
<u>Especie iniciadora</u>	AAPH (radicales peroxilo)	AAPH/ H_2O_2 - Cu^{2+} / $CuSO_4$	AAPH (radicales peroxilo)	ABAP (radicales peroxilo)	Radical DPPH [*]	Ferrilmioglobina/ H_2O_2 / $K_2S_2O_8 \rightarrow ABTS^{\cdot+}$	Reducción: $TPT-Fe^{3+}$ a $TPL-Fe^{2+}$	Potencial eléctrico	AAPH/ H_2O_2 /perborato \rightarrow luminol [†]	ABAP (radicales peroxilo)
<u>Medida</u>	Oxígeno consumido	Inhibición de la caída de fluorescencia de PE/FL	Inhibición de oxidación de DCFH-DA	Inhibición de la oxidación de crocina	Descenso de DPPH [†]	Descenso de $ABTS^{\cdot+}$	Reducción: $TPT-Fe^{3+}$ a $TPL-Fe^{2+}$	Capacidad reductora	Inhibición de quimioluminiscencia	Inhibición de oxidación de α -ceto- γ -m-butiúrico
<u>Técnica</u>	Electrodo de oxígeno	Fluorimetría	Espectrofotometría / Fluorimetría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Voltametría cíclica	Quimioluminiscente	Cromatografía de gas
<u>Cuantificación</u>	Longitud de fase de retraso	FI a λ_{ex} 540 y λ_{em} 565 nm técnica AUC	Abs: 504 nm/ FI: λ_{ex} 504 λ_{em} 529 nm- Fase de retraso	Abs: 443 nm/ competición cinética	Absorbancia a 515 nm	Absorbancia a 414 nm	Absorbancia a 55 nm y calrado $FeSC \cdot 7H_2O$	Curva de potencial de corriente	Tiempo que dura la inhibición	AUC y comparación con reacción basal
<u>Expresión de resultados</u>	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	EC50 muestra que disminuye 50% DPPH [*]	Equivalentes de Trolox	$\mu mo Fe^{2+} / L$	$E_{1/2}$: Potencial de oxidación I_a : corriente anódica	Equivalentes de Trolox	Relativo a concentración 1 μM de antioxidante
<u>Muestras</u>	Alimentos, muestras biológicas	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas	Muestras biológicas	Muestras biológicas	Fenoles, alimentos, bebidas	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas	Alimentos, bebidas, muestras biológicas	Compuestos puros, muestras biológicas	Fluidos biológicos	Compuestos puros, tejidos



2.4.1. Capacidad de captura del radical libre DPPH

El método que se empleó en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams et al. (1995), método que permite evaluar la actividad de sustancias frente al radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en una solución metanólica que tiene un color violeta intenso que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene antioxidantes^[7]. Así, el grado de decoloración de la solución indica la eficiencia de la capacidad secuestrante de la sustancia agregada^[20]. La decoloración del radical se determina a 517 nm y la cuantificación se realiza empleando soluciones patrón de ácido gálico o ácido ascórbico^[7]. En la **Figura 6** se observa la reacción del DPPH con un agente antioxidante.

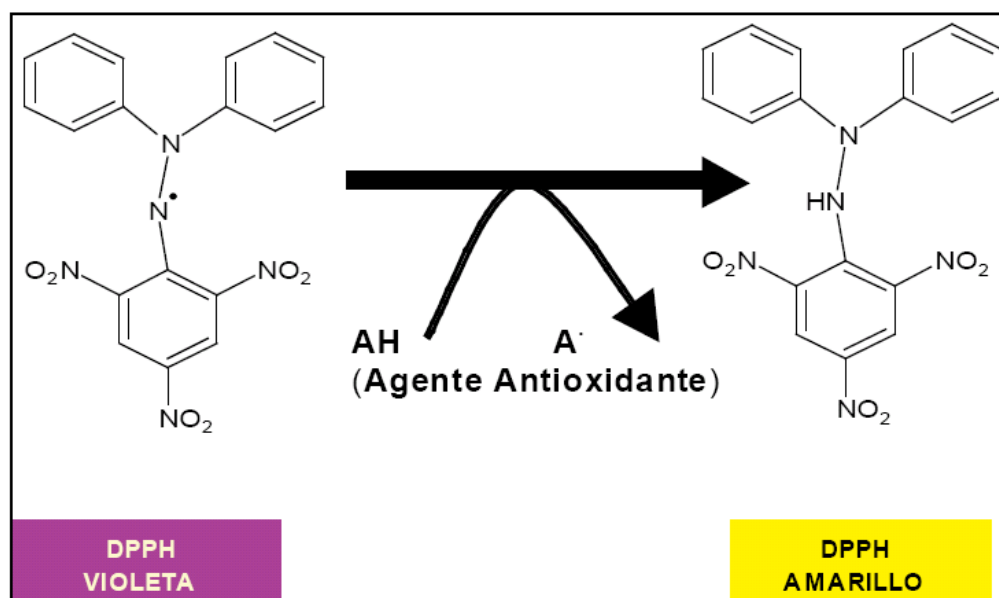
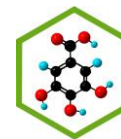


Figura 6. Esquema de Reacción del DPPH^[21].

El DPPH no reacciona con flavonoides que no contengan grupos –OH en el anillo B al igual que con los ácidos aromáticos que solo contiene un grupo –OH. Pese a sus limitaciones, es un método adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, mientras que no es adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma o suero, ya que las proteínas precipitan con el metanol del medio de reacción^[7].



2.4.2. Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS•+)

El método ABTS es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante de un material biológico, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica.

Involucra un compuesto coloreado de naturaleza radical, (ABTS•+), con el fin de simular especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; de esta manera la presencia del antioxidante conduce a la desaparición de este radical coloreado. El radical (ABTS•+) debe ser generado mediante reacciones químicas (dióxido de manganeso, persulfato de sodio) o enzimáticas (peroxidasa, mioglobina). Dicho radical, tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y orgánicos. El radical (ABTS•+) es el más indicado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos coloreados, como en el caso de las antiocianinas, por presentar una absorbancia máxima próxima a la región infrarroja (754 nm), reduciendo así, las posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de reacciones secundarias^[22]. En la **Figura 7** se observa el esquema de reacción del ABTS.

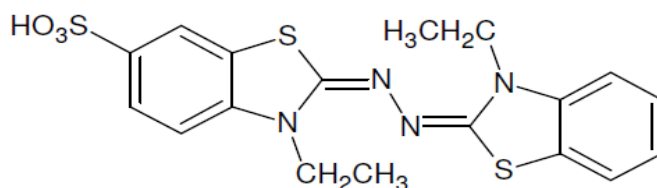
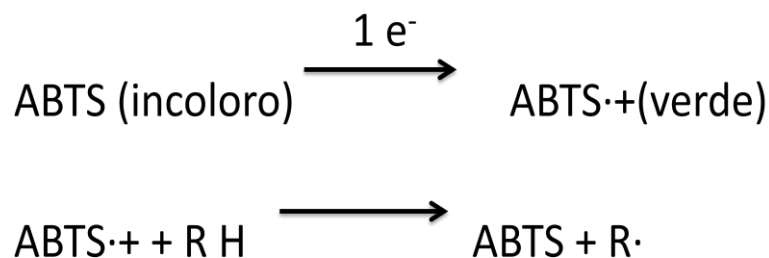
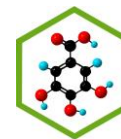


Figura 7. Esquema de reacción del ABTS.



2.5. Determinación de Fenoles Totales (Ensayo de Folin-Ciocalteu [FC])

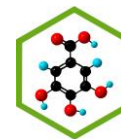
El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años para medir el contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total^[23].

Este método consiste en la oxidación de los compuestos fenólicos de la muestra por el reactivo de Folin-Ciocalteu el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{HW}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 760 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico o catequinas^[7].

2.6. Método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ninguna otra técnica de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía^[24, 25].

El HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o Cromatografía líquida de alta eficiencia, es una técnica cromatográfica para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica. Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil. Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, los más comunes son Metanol y Acetonitrilo, también suelen usarse sales y buffers



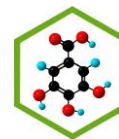
para contribuir a la separación de componentes. También se usa el Ácido Trifluoroacético para actuar como formador de pares iónicos.

Estas combinaciones introducen el concepto de gradiente de elución. Consiste en la variación de la composición de la fase móvil, para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito en función de la afinidad del analito por la composición de la fase móvil. Cada analito tiene un gradiente de elución óptimo para obtener la máxima separación de picos en el detector^[24].

2.7. Descripción de la familia Rubiaceae y del género *Palicourea*

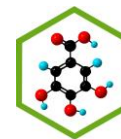
Rubiaceae es una de las familias más importantes en los trópicos dada su gran diversidad y su amplia cobertura de ecosistemas, que van desde las zonas costeras y de manglares hasta las zonas de páramos^[26]. Es una gran familia distribuida por toda la Tierra, aunque tiene su máxima expresión en las regiones tropicales y subtropicales. Es una de las más diversas a nivel mundial, ya que ocupa el cuarto lugar después de Asteraceae, Orchidaceae y Poaceae, con alrededor de 10.700 especies. Para Colombia se registran más de 730 con su mayor diversidad en la región Andina^[26], Amazónica y del Chocó biogeográfico^[4].

Las características clásicas de Rubiaceae son hojas opuestas de borde entero (sólo una especie con borde lobulado) y estípulas inter o intrapeciolares, cáliz de sépalos fusionados en un tubo al igual que la corola (gamosépalas y gamopétala), ovario ínfero y frutos carnosos indehiscentes y de tipo cápsula^[4]. El Género *Palicourea* es bastante afín al género *Psychotria*; su principal diferencia es el anillo de tricomas en el interior del tubo de la corola. Algunas especies de este género se distinguen vegetativamente por la forma de la estípula con dos lóbulos triangulares a cada lado del nudo y las venas secundarias arqueadas, sobresalientes y que se disipan antes de llegar a la margen de la lámina. En este género se presenta muy marcado el fenómeno de la heterostilia dimorfa o heterodistilia. En los individuos se presentan flores de estilo largo y estigma corto (de igual longitud o excediendo al tubo de la corola) con estambres cortos y flores con estilo corto y lóbulos del estilo largo (mucho más corto que el tubo de la corola) con estambres ligeramente exertos^[4].



2.7.1. Importancia de la familia Rubiaceae

Muchas Rubiaceae producen alcaloides que se encuentran normalmente acumulados en la corteza, raíces, hojas, flores, frutas, semillas y polen. De los 70 géneros neotropicales se tiene: *Antirhea*, *Cinchona*, *Coutarea*, *Capirona*, *Bothriospora*, *Borreria*, *Exoterma*, *Ferdinandusa*, *Genipa*, *Hedyotis*, *Hillia*, *Ladenbergia*, *Pogonopus*, *Palicourea*, *Psychotria*, *Rimijia*, *Spermacoce*, *Tocoyena*, *Uncaria* y otros, la mayoría pertenecen a la tribu *Cinchonoideae*, que producen quinina. Hasta 1970 se habían detectado 156 diferentes alcaloides, actualmente esta cifra ha debido incrementarse^[27]. La familia es una de las fuentes primarias de productos naturales (medicina, alucinógenos y venenos). Muchos géneros de *Cinchoneae* (*Cinchona*, y *Ladenbergia*) son fuentes de quina, el único remedio para la malaria hasta que se puso disponible la droga sintética^[27].



3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

3.1.1. Condiciones instrumentales generales

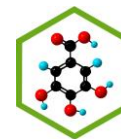
- HPLC marca JASCO 2000 plus (Mary's Court Easton, Maryland; USA), equipado con bomba de gradiente cuaternario PU-2089 plus, automuestreador inteligente AS-2059 plus, horno de columna CO-2065 plus, detector inteligente de arreglo de diodos MD-2015 plus, un LC Net II/ADC y controlado por el software EZChrom Elite.
- Balanza analítica OHAOS, modelo PA214.
- Ultrasonido Fisher Scientific, modelo FS60H
- Vortex Fisher Scientific
- Espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Fisher Scientific, Modelo 4001/4
- Espectrofotómetro UV-VISIBLE marca Shimadzu UV-1700 PharmaSpec.

3.1.2. Reactivos empleados

Los reactivos empleados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Reactivos empleados.

Reactivo	
Metanol grado HPLC marca Merck	Dimetilsulfóxido 99,9% Marca Fischer
<i>n</i> -Hexano grado HPLC marca Merck	Ácido Ascórbico 99,7% Marca Carlo Erba
Diclorometano grado HPLC marca Merck	Ácido Gálico 99,0% Marca Panreac
Acetato de Etilo grado HPLC marca Merck	Persulfato de Potasio 99,0% Marca Merck
DPPH marca Merck	Carbonato de Sodio Marca Merck
ABTS marca Sigma	Ácido Cítrico 99,5% Marca Merck
Folin-Ciocalteu Marca Panreac	Fosfato sódico dibásico 99,8% Marca JT Beaker
Columna Chromolith Performance RP-18e 100-4.6mm	Columna DIAION HP-20



3.1.3. Material vegetal

La parte aérea de la especie *Palicourea guianensis* fue colectada en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira-Risaralda, el día 24 de Abril de 2009 a las 10:23 AM, por el Dr. José Hipólito Izasa Martínez, Dorian Ruíz Penagos y Leidy Johanna Tapias Izasa. Posteriormente se envió una muestra de este material recolectado al Herbario Nacional de Colombia, en donde fue identificada por el Dr. O. A. Jara (No. COL 519790).

3.2. Métodos

3.2.1. Extracción de material vegetal

El material recolectado se dejó secar a temperatura ambiente por 8 días. Posterior a esto, fue secado en una estufa a 50 °C durante 2 días, finalmente se separaron las ramas de las hojas y por último las hojas secas fueron molidas y almacenadas.

3.2.1.1. Obtención del Extracto crudo.

Para la extracción se homogenizaron 600 g del material seco y molido, se dividió en 6 porciones de 100 g cada una, para facilitar la extracción. A cada porción de 100 g se le adicionó 6 L de metanol en porciones sucesivas de 1 L y se extrajo en el ultrasonido durante 20 minutos cada porción de 1 L. Finalmente se filtró a gravedad y se redujo el volumen mediante rotaevaporación, el esquema de la extracción se muestra en la **Figura 8**.

El extracto crudo fue nombrado PgMETOH, al cual se realizó espectro de absorción UV en un Espectrofotómetro UV-VISIBLE marca Shimadzu UV-1700 PharmaSpec, el barrido se realizó entre 200 nm y 450 nm, usando como blanco metanol. Esto se hizo con el fin de observar posibles compuestos presentes en el extracto de acuerdo a sus longitudes de onda de máxima absorción. Posterior a esto se llevó a cabo una corrida en HPLC con el fin de observar tipos de compuestos presentes en el extracto obtenido.

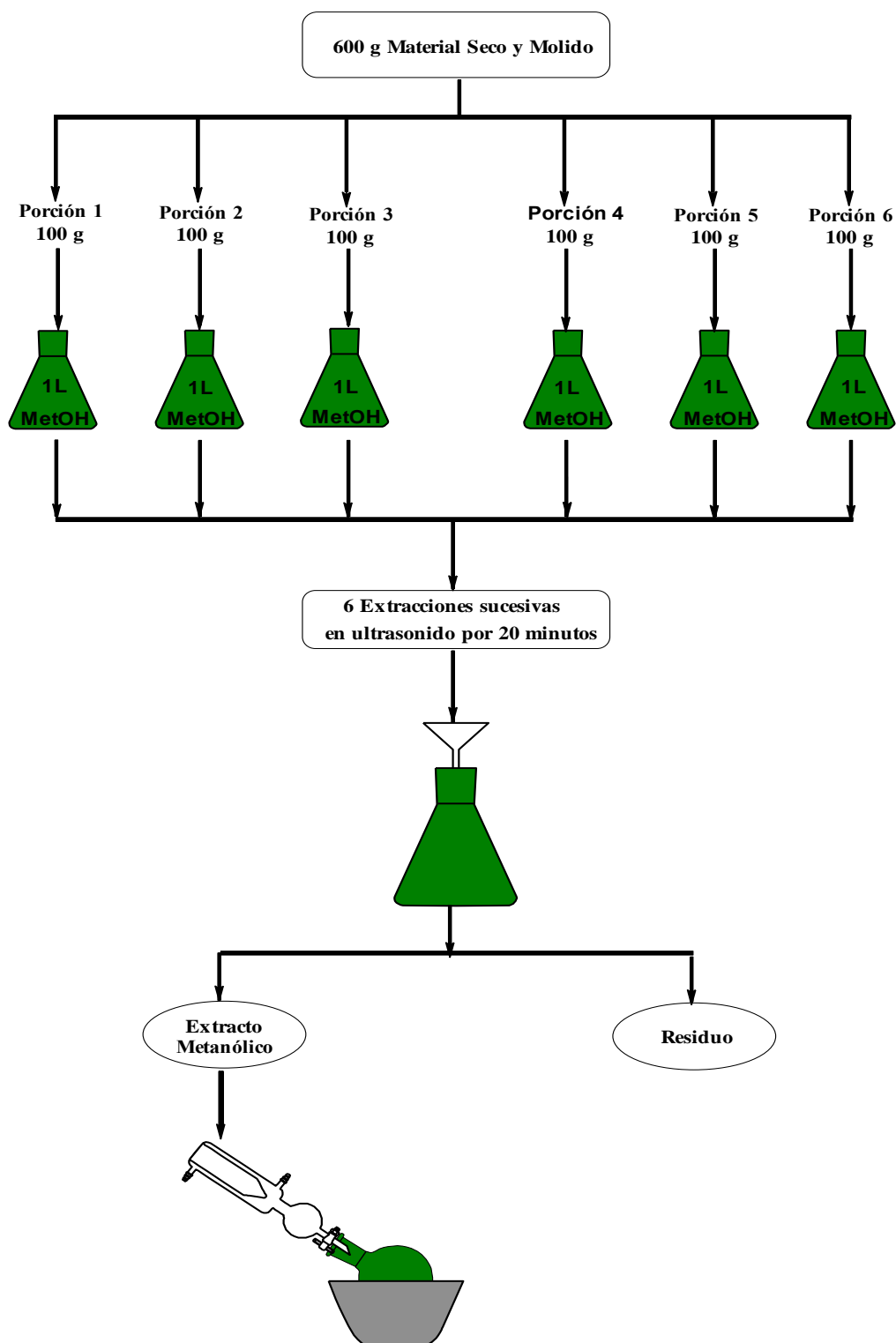
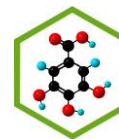
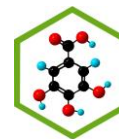


Figura 8. Esquema de la extracción inicial del material vegetal.



3.2.1.2. Extracción Líquido-líquido del extracto crudo (PgMETOH)

A 1800 mL del extracto crudo en metanol (PgMETOH) se le adicionó agua hasta obtener un volumen de 2000 mL. Dicho volumen fue dividido en 8 porciones, a las cuales se les realizó extracción líquido-líquido con 200 mL de *n*-hexano 5 veces, al finalizar la extracción, el extracto en *n*-hexano obtenido fue llevado a sequedad y se nombró PgHF.

La fase hidro-alcohólica resultante fue sometida a rotavaporación para eliminar el metanol obteniendo 600 mL de residuo acuoso que fue dividido en 3 porciones las cuales fueron sometidas a extracción líquido-líquido con 200 mL de diclorometano 3 veces, obteniendo así el extracto en diclorometano, el cual fue llevado a sequedad mediante rotavaporación y rotulado como PgDF.

La fase acuosa fue sometida nuevamente a extracción líquido-líquido con 200 mL de acetato de etilo 3 veces, así se obtuvo el extracto en acetato de etilo. Este se llevó a sequedad y se marcó como PgAEF, el residuo acuoso también se concentró mediante rotavaporación y se nombró PgAF. De esta manera se obtuvieron los diferentes extractos a evaluar^[28], el esquema que representa las extracciones realizadas se muestra en la **Figura 9**.

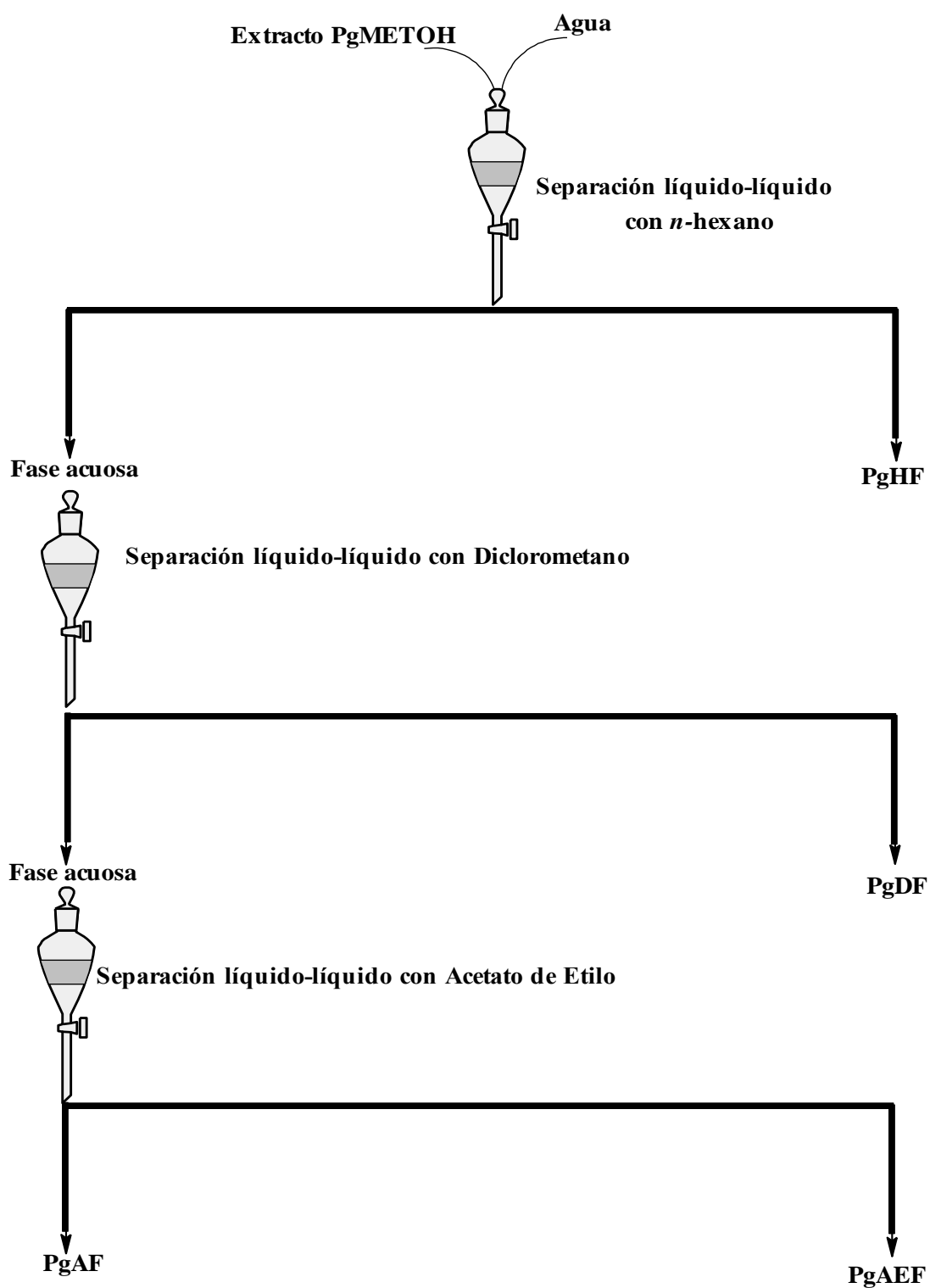
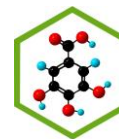
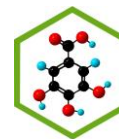


Figura 9. Esquema de la extracción líquido-líquido a partir del extracto metanólico.



3.2.1.3. Fraccionamiento Extracto Acuoso (PgAF)

Se eligió el extracto acuoso (PgAF) para ser fraccionado debido a que fue el extracto promisorio en las evaluaciones realizadas a través de los métodos de captura de electrones, presentando un mayor nivel de actividad antioxidante con un IC_{50} de 3912 ppm. Este proceso de fraccionamiento se realizó sobre DIAION HP-20, utilizando un gradiente de agua-metanol, se varió la proporción de los solventes en un 5% por etapa, iniciando en un 100% de agua y finalizando en un 100% de metanol. Esta columna permite separar moléculas de diferentes dimensiones al interior de una mezcla. Durante la elusión, las moléculas que son muy grandes para entrar en los poros del material empleado corren rápidamente en el espacio circundante y son las que salen primero de la columna, es decir son excluidas. Mientras que las moléculas que son capaces de sumergirse en los poros del material, durante su migración sufrirán un retraso inversamente proporcional a las dimensiones moleculares. Por lo tanto las moléculas más pequeñas son las que más se retienen y por ende las últimas en salir de la columna^[25]. Al emplear un gradiente de agua-metanol en la elusión de las fracciones, se espera que además de eluir por tamaño, se separen también por polaridad, ya que esta se va disminuyendo a medida que se va variando de agua a metanol durante la elusión.

De este fraccionamiento se recogieron 44 fracciones de 500 mL cada una, a las cuales se les nombró PgAF-1 hasta PgAF-44, como se puede observar en la **Figura 10**.

A las 44 fracciones se les monitoreó por HPLC, haciendo uso del método empleado para el extracto metanólico (PgMETOH). Dichos monitoreos permitieron reunir las fracciones semejantes, disminuyendo así el número de las mismas.

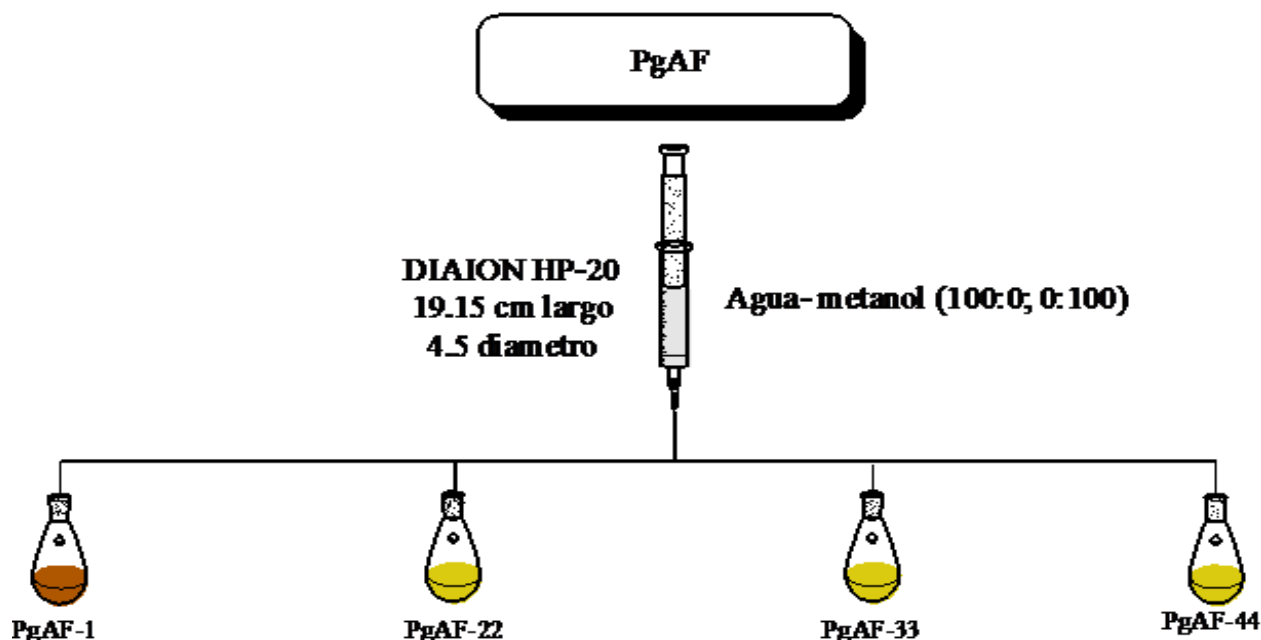
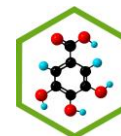
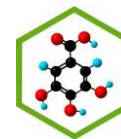


Figura 10. Fraccionamiento del Extracto PgAF.

3.2.2. Caracterización fitoquímica de compuestos antioxidantes de los extractos de *Palicourea guianensis*

El objetivo fundamental de esta caracterización es determinar la presencia de compuestos relacionados con la actividad antioxidante evaluada, entre los cuales se encuentran fenoles, taninos y antocianinas^[18]. La caracterización se hizo comparando las longitudes de onda de máxima absorción de cada extracto con las longitudes de onda características de los compuestos de interés^[29].

Los extractos orgánicos PgMETOH, PgAEF y PgAF, obtenidos de la especie *Palicourea guianensis* fueron corridos por HPLC, la metodología empleada está basada en un seguimiento realizado a los extractos por cromatografía en capa fina en fase reversa y fase normal empleando como eluente ácido fosfórico 0.05%-isopropanol (7:3) para cromatografía en fase reversa y para



fase normal se empleó una mezcla de hexano-acetona (60:40), como se observa en las **Figuras 11** y **12** se logra una mejor elusión en fase reversa. Debido a la polaridad de los extractos PgHF y PgDF no se consideró conveniente correrlos por HPLC bajo estas condiciones, ya que podrían quedarse retenidos en la columna RP-18 empleada afectando el funcionamiento de la misma.

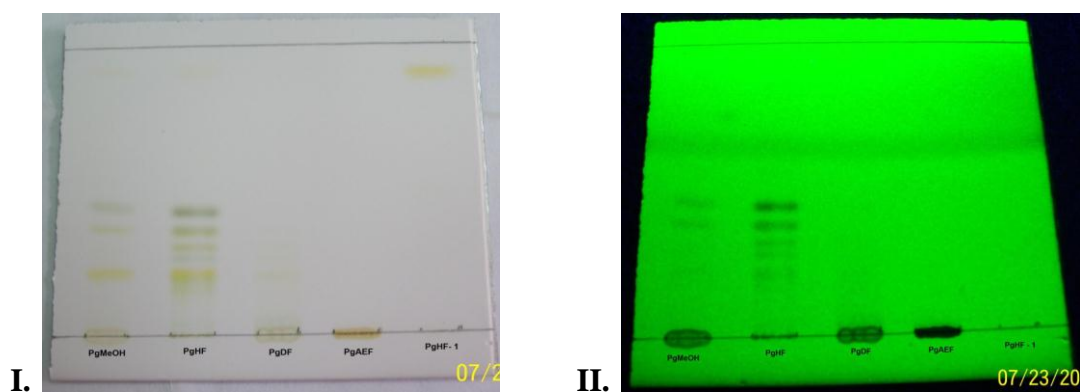


Figura 11. Placa cromatográfica en fase normal de los extractos, I. Visible, II. Onda corta.

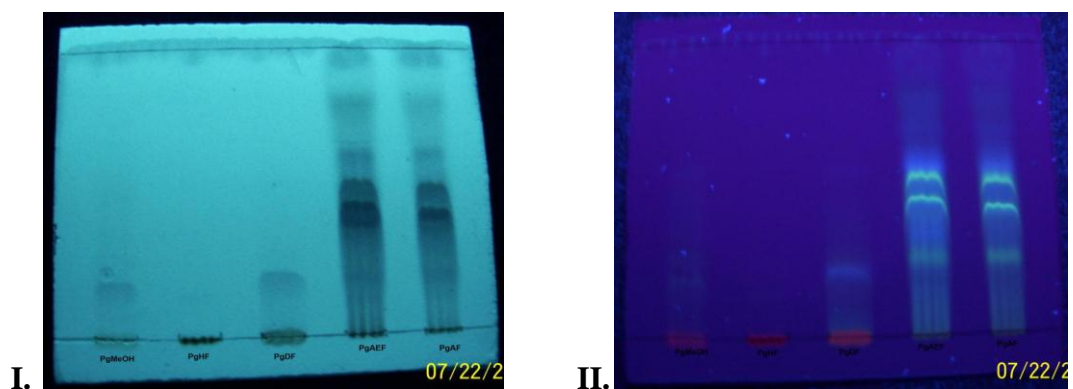


Figura 12. Placa cromatográfica en fase reversa de los extractos, I. Onda corta, II. Onda larga.

3.2.2.1. Gradiente de ácido fosfórico e isopropanol

Se realizó una elución con un gradiente de ácido fosfórico 0,05% (solvente A): isopropanol (solvente B) variando las proporciones de los solventes, como se muestra en la **Figura 13**, las condiciones del equipo se muestran a continuación en la **Tabla 4**.

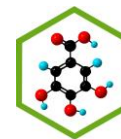


Tabla 4. Condiciones cromatográficas del equipo empleadas para la separación con gradiente de los extractos de *Palicourea guianensis*.

Columna	Chromolith Performance RP-18e 100-4.6mm
Flujo	4 mL/min
Gradiente	ácido fosfórico 0,05% (A) – isopropanol (B) 0-2 min (99-1); 9,5-12 min (80-20); 16-20 min (80-20)
Tiempo de corrida	20 min
Detector	PDA (200-450 nm)
Volumen de Inyección	20 µL
Temperatura	40 °C

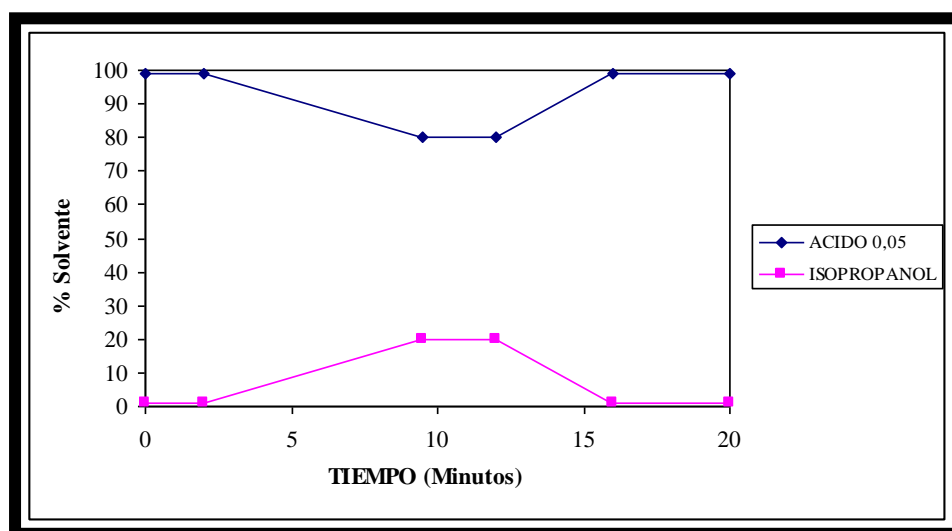
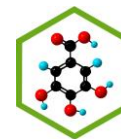
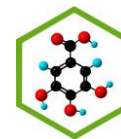


Figura 13. Variación en el tiempo de la proporción de los solventes A (ácido fosfórico 0,05%) y B (isopropanol) para el método cromatográfico empleado.



Con el fin de confirmar la presencia de los metabolitos secundarios asociados a los picos de máxima absorción encontrados para cada extracto, se realizaron las siguientes pruebas de caracterización, la identificación se realizó en forma cualitativa.

- Ensayo con Reactivo de Dragendorff: Se tomó 0,5 mL de extracto en un tubo de ensayo y se adicionó una gota de Reactivo de Dragendorff, se considera prueba positiva para alcaloides la presencia de precipitado^[30].
- Ensayo con Reactivo de Mayer: Se tomó 0,5 mL de extracto en un tubo de ensayo y se adicionó una gota de Reactivo de Mayer, la presencia de precipitado se considera prueba positiva para alcaloides^[30].
- Ensayo con Cloruro Férrico: A 1 mL extracto en un tubo de ensayo limpio se adicionó 1 gota de FeCl_3 al 1% acuoso o alcohólico y se agitó. La aparición de coloraciones violetas, verdes, azules u oscuras se consideró prueba positiva para compuestos de tipo fenólico^[30].
- Prueba con Gelatina-NaCl: Se tomó 1 mL de extracto en un tubo de ensayo limpio. Se añadió 1 mL de solución de gelatina-sal (0,1 g Gelatina + 1 g NaCl en 10 mL de agua). La formación de un precipitado fue considerada prueba positiva para taninos^[30].
- Ensayo de Liebermann-Burchard: Se mezcló 1mL de extracto con 1 mL de reactivo de Liebermann-Burchard, se considera prueba positiva para esteroides y triterpenos cuando aparecen coloraciones violeta, verde o azul^[30].
- Prueba para saponinas: Se tomó 1 mL de extracto, se adicionó 5 mL de agua destilada y se agitó fuertemente por un minuto. La presencia de espuma mínimo por un minuto, fue considerada prueba positiva para saponinas.

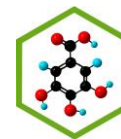


- Prueba para cumarinas: Se calentó el extracto en un tubo de ensayo tapado con papel filtro previamente impregnado de NaOH 1%. Las cumarinas fueron recogidas en el papel filtro. Si el papel exhibe puntos fluorescentes bajo luz ultravioleta, se considera prueba positiva para cumarinas.
- Prueba para Flavonoides: Se tomaron unas gotas del extracto y se adicionaron gotas de NaOH, la aparición de una coloración amarilla o naranja se considera positiva para flavonoides.
- Ensayo con agua de bromo: En un tubo de ensayo se adicionaron unas gotas de extracto y unas gotas de agua de bromo. La presencia de precipitado se considera prueba positiva para taninos condensados, los taninos hidrolizables no precipitan^[30].

3.2.3. Determinación de Fenoles Totales

Los compuestos antioxidantes generalmente contienen grupos fenólicos^[31]. Debido a esto, se comparó el contenido de compuestos fenólicos en cada uno de los extractos para obtener más información acerca de la posible capacidad antioxidante de cada uno de ellos.

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó aplicando a cada uno de los extractos en estudio el siguiente procedimiento^[31]: a 50 μ L de muestra se le adicionó un volumen de 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu^[32], 1 N. Después de 1 minuto, se añadió 750 μ L de solución acuosa de carbonato de sodio al 20% (p/v), y se llevó a un aforo de 5,0 mL con agua. Los controles, por su parte, contenían todos los reactivos con excepción del extracto a evaluar. Luego de 30 minutos de incubación a 25°C, se midió las absorbancias a 760 nm y se comparó con una curva de calibración usando soluciones patrón de ácido gálico (50-600 mg/L). El contenido de



fenoles totales se determinó como los equivalentes de ácido gálico (GAE, mg de ácido gálico/g de extracto), y los valores son presentados como la media de los datos del análisis llevado a cabo por triplicado^[31].

3.2.4. Determinación de la actividad antioxidante

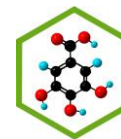
La evaluación de los diferentes extractos obtenidos se realizó de acuerdo a las metodologías de captura de electrones DPPH y ABTS, se preparó cada extracto a 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 y 5000 ppm, empleando como solvente DMSO al 3%.

Para cada metodología se realizaron tres ensayos con tres repeticiones cada uno, teniendo un total de nueve datos para cada concentración evaluada y para cada control empleado. Los datos obtenidos fueron tratados en el programa estadístico GraphPad Prism 5 y se hallaron los porcentajes de inhibición para cada extracto evaluado.

3.2.4.1. Capacidad de captura del radical libre DPPH

Se midió y comparó la actividad captadora del radical DPPH• de los diferentes extractos orgánicos provenientes de la especie en estudio. Para la medición de la actividad inhibidora del radical libre DPPH se empleó el método planteado por Brand-Williams et al (1995)^[33]. Se preparó una solución patrón de 2000 ppm del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) en metanol grado analítico, dicha solución fue almacenada a 0° C, en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio para mayor protección contra la luz. Para efectos de esta evaluación se utilizó una solución de trabajo de DPPH a 20 ppm, preparada diariamente a partir de la solución patrón, almacenada en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio y conservada en baño de hielo.

Se realizó un seguimiento a las reacciones, entre las muestras a las concentraciones mencionadas (de 1000 a 5000 µg/mL) con la adición de la solución de DPPH previamente preparada. Adicionalmente, como solución de referencia se utilizó DMSO 3% disuelto con la solución de trabajo de DPPH a 20 ppm. Igualmente se prepararon soluciones blanco de las muestras disueltas con metanol a las mismas concentraciones consideradas previamente, una solución de referencia



con DMSO 3% y metanol, un control positivo con ácido ascórbico y otro con ácido gálico. Todas las soluciones resultantes fueron incubadas en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se midió en el espectrofotómetro las absorbancias para todas las soluciones a 517 nm^[31].

3.2.4.1.1. Determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀)

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas de acuerdo con la siguiente expresión matemática^[31]:

$$\%inhibición\ radical\ DPPH = \left[1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_r - A_{br}} \right] * 100$$

Donde Am es la absorbancia de las muestras, Abm es la absorbancia del blanco de muestra, Ar es la absorbancia de las soluciones de referencia y Abr la absorbancia del blanco de referencia.

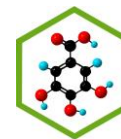
Luego de haber calculado los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones, estos fueron ajustados a una regresión en el programa estadístico GraphPad Prism 5 y con base en esta curva se determinó la concentración media inhibitoria (IC₅₀), las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado con tres repeticiones cada una^[31].

3.2.4.2. Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS•+)

Se llevó a cabo la metodología desarrollada por Re et al (1999)^[34] y descrita por Kuskoski et al (2004)^[22], sujeta a algunas modificaciones.

3.2.4.2.1. Preparación del radical ABTS •+

La preparación de este radical se llevó a cabo mediante la reacción de persulfato de potasio (2,45 mM) con ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) (7 mM). Para esto se colocaron 3,3 mg de persulfato de potasio y 19,4 mg del reactivo ABTS en un frasco, se añadió 5



mL de agua destilada. La mezcla se agitó perfectamente y el frasco fue cubierto con papel aluminio dejándolo reposar 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez formado el radical, este se diluyó en una solución buffer acuosa citrato-fosfato de pH 7,4 hasta alcanzar una absorbancia de 0,700 a una longitud de onda de 734 nm.

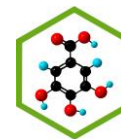
3.2.4.2.2. Evaluación de la actividad inhibidora del catión radical ABTS •+

Para cada uno de los extractos se prepararon soluciones de diferente concentración (de 1000 a 5000 µg/mL) disueltas en DMSO 3%, a las cuales se adicionó la solución radical ABTS •+, disuelta en una solución buffer acuosa citrato-fosfato de pH 7,4 y con una absorbancia de 0,700 a la longitud de onda de máxima absorción (734 nm). Cada concentración se evaluó por triplicado. Como blancos de muestra se utilizaron las mismas concentraciones preparadas en la solución buffer de pH 7,4. Para la referencia se preparó solución buffer con la solución ABTS y por último, para el blanco de referencia se hizo una repetición que contenía DMSO con la solución buffer pH 7,4. Una vez obtenidas las mezclas se dejaron incubar durante media hora y se midió la absorbancia a 734 nm en el espectrofotómetro.

Posteriormente se calculó los porcentajes de inhibición para cada concentración evaluada haciendo uso de la misma expresión matemática empleada para el análisis de la capacidad de captura del radical DPPH•^[31].

$$\%inhibición\ catión\ radical\ ABTS = \left[1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_r - A_{br}} \right] * 100$$

Donde A_m es la absorbancia de las muestras, A_{bm} es la absorbancia del blanco de muestra, A_r es la absorbancia de las soluciones de referencia y A_{br} la absorbancia del blanco de referencia.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fitoquímica de compuestos antioxidantes de los extractos de

Palicourea guianensis

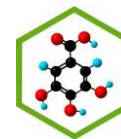
Para cada uno de los extractos obtenidos se realizó un espectro UV con el fin de observar los picos de máxima absorción de cada extracto, los espectros se muestran en los **Anexos 1, 2, 3, 4 y 5**. Las longitudes de onda de máxima absorción se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Picos de máxima absorción de los espectros UV de cada extracto.

Extracto	Longitud de onda de máxima absorción (nm)
PgMETOH	222, 282, 326, 409
PgHF	222, 282, 409
PgDF	282, 409
PgAEF	220, 280, 285, 324
PgAF	220, 280, 285, 324

En la extracción con solventes polares como metanol y agua, se separan, en su gran mayoría, los metabolitos secundarios polares de la matriz vegetal. Según los cromatogramas y espectros ultravioleta (UV) obtenidos de los extractos, se tienen unos máximos de absorción en longitudes de onda que al ser comparados con la literatura permite inferir los tipos de compuestos presentes en los extractos.

Para los extractos PgMETOH, PgAEF y PgAF se tienen cromatogramas obtenidos por HPLC con sus respectivas longitudes de onda de máxima absorción correspondientes a cada tiempo de retención encontrado, los cromatogramas de cada extracto se muestran en los **Anexos 5, 6 y 7** respectivamente. En dichos cromatogramas se observan los tiempos de retención y las longitudes de onda de máxima absorción características para cada extracto presentadas en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Tiempos de retención y picos de máxima absorción para cada extracto.

Extracto	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda de máxima absorción en UV (nm)
PgMETOH	5,00	322
	12,25	323
	13,37	282, 324
	15,47	280, 316
	18,82	280
PgAEF	0,86	271
	3,41	321
	4,37	322
	5,13	275
	6,30	280
PgAF	2,69	235
	4,75	316
	11,74	323
	15,22	280
	17,57	275

Estas longitudes de onda se comparan con los picos de máxima absorción de compuestos de interés para la actividad evaluada, como flavonoides, taninos y antocianinas, con el fin de observar que longitudes de onda coinciden con las presentadas por los extractos. Con este fin se construyó la **Tabla 7**, en donde se observan las longitudes de onda de máxima absorción encontradas en la literatura^[29] para los compuestos de interés para la actividad antioxidante evaluada y se muestra cuáles de los extractos pueden poseer este tipo de compuestos según las longitudes de onda de máxima absorción obtenidas para los extractos.

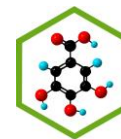
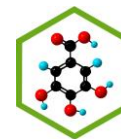


Tabla 7. Longitudes de onda características de los compuestos de interés presentes en los extractos.

Extracto	Compuesto y longitud de onda de máxima absorción (nm) ^[29]						
	Alcaloides (260-280)	Taninos (211-270)	Flavonoides (200-270)	Flavononas (250-300)	Flavonas y flavonones (330-375)	Leucoantocianidinas catequinas (280) Isoflavonas (250-290)	Antocianinas (500-530 430-440 270-280)
PgMETOH	280, 282	---	222	280, 282	---	280, 282	280, 282
PgHF	282	---	222	282	---	282	282
PgDF	282	---	---	---	---	282	282
PgAEF	280	271, 275	271	275, 280	---	280	275, 280
PgAF	280	275	235	275, 280, 316	323	280	275, 280

Aunque el perfil quimio-taxonómico de las plantas Rubiaceae ha sido poco estudiado, trabajos anteriores revelan que la especie *Palicourea angustifolia*, reporta un contenido moderado de alcaloides y taninos, ausencia de esteroides y triterpenos y un alto contenido de saponinas^[35]. Según esto, se esperaba encontrar compuestos de este tipo en los extractos evaluados, por lo que se compararon las longitudes de onda obtenidas para cada extracto con las encontradas en la literatura para presumir los tipos metabolitos secundarios presentes en los extractos.

Como se observa en la **Tabla 7**, los diferentes extractos evaluados presentan picos de absorción que coinciden con las longitudes de onda de máxima absorción características encontradas para alcaloides, taninos, flavonoides, y antocianinas^[29], por lo que fue necesario confirmar la presencia de dichos compuestos a través de pruebas de caracterización de los diferentes metabolitos secundarios, ya que estudios anteriores revelan que tanto el género *Palicourea* como la familia Rubiaceae han reportado presencia de una variedad de metabolitos secundarios, incluidos los alcaloides, cumarinas y compuestos fenólicos^[36], dichos compuestos reportan diferentes actividades biológicas, siendo descritos principalmente como antioxidantes potenciales^[36-40]. Por lo que se considera de gran importancia la presencia de éstos compuestos en los extractos evaluados en el presente trabajo.

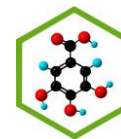


Los resultados obtenidos en la caracterización de los metabolitos secundarios se resumen en la **Tabla 8**. Los resultados se expresan así: no tiene presencia (-), presencia escasa (+), presencia leve (++) , presencia moderada (+++), presencia abundante (++++).

Tabla 8. Resultados de las pruebas de caracterización de los metabolitos secundarios.

Prueba	Extracto				
	PgMETOH	PgHF	PgDF	PgAEF	PgAF
Ensayo con reactivo de Draggendorff	-	++	-	-	-
Ensayo con reactivo de Mayer	-	++	++	-	-
Ensayo con Cloruro Férrico	-	-	-	+++	+++
Prueba con Gelatina-NaCl	-	+++	+++	++	++
Ensayo de Liebermann-Burchard	+	+	-	-	-
Prueba para saponinas	+	++	+++	++++	++
Prueba para cumarinas	++	-	++	+++	+++
Prueba para flavonoides	-	+	-	++	++
Ensayo con agua de bromo	-	+++	+++	+	+

Estos resultados concuerdan con las longitudes de onda de máxima absorción mostradas por los extractos, confirmando así la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas y saponinas en los diferentes extractos evaluados en el presente estudio. La presencia de estos metabolitos es de gran importancia para la evaluación de la actividad antioxidante, ya que este tipo de compuestos presentan antecedentes en diferentes actividades biológicas, por lo que se espera encontrar actividad dentro de los extractos evaluados.

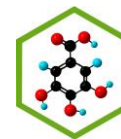


4.2. Fraccionamiento Extracto acuoso (PgAF)

Las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso, fueron también monitoreadas por HPLC, a través del mismo método utilizado para los demás extractos con el fin de establecer cuáles de estas fracciones presentan características similares para reunirlos y disminuir así el número de fracciones. La **Tabla 9** muestra las fracciones reunidas. No se incluyeron los extractos 1 al 5 debido a que se contaminaron y tenían presencia de hongos que pudieron causar degradación de compuestos dentro de los extractos, por lo que los resultados a partir de estas fracciones no serían confiables.

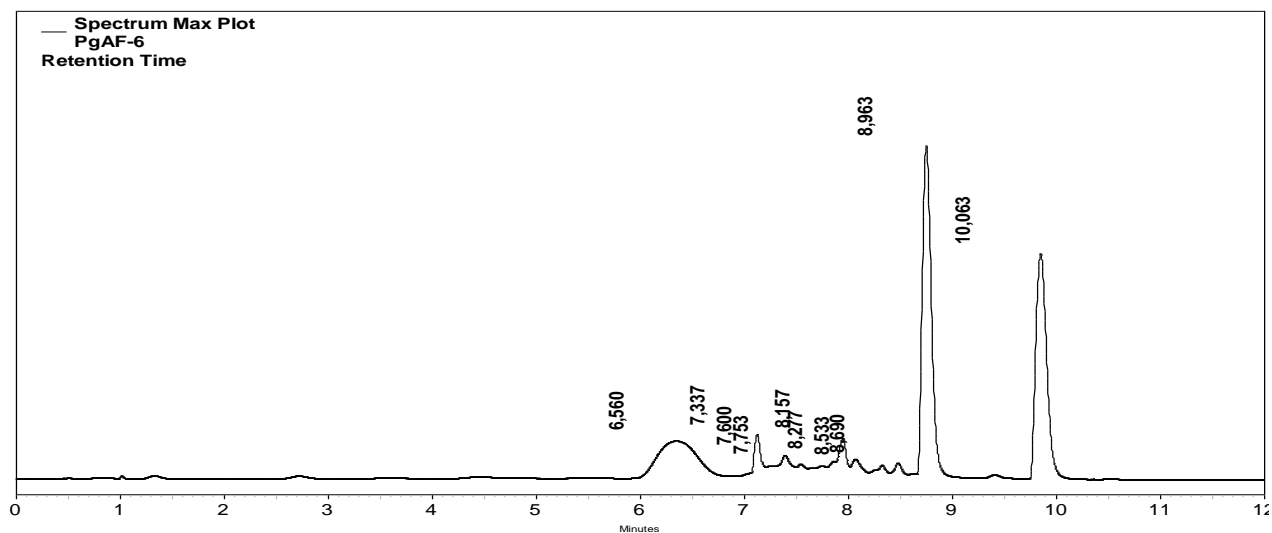
Tabla 9. Fracciones del extracto acuoso (PgAF) reunidas.

Fracciones reunidas	Rotulado
6+7	PgAF-6+7
8	PgAF-8
9	PgAF-9
10+11+12+13	PgAF-10-13
14+15	PgAF-14+15
16+17	PgAF-16+17
18	PgAF-18
19	PgAF-19
20	PgAF-20
21	PgAF-21
22+23+24+25+26+27	PgAF-22-27
28	PgAF-28
29	PgAF-29
30+31	PgAF-30+31
32+33+34	PgAF-32-34
35	PgAF-35
36+37+38+39+40+41+42+43+44	PgAF-36-44

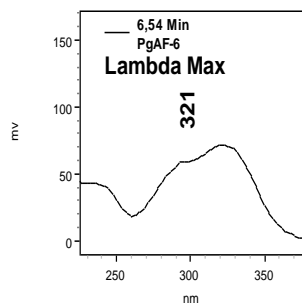


En la **Figura 14** se muestran los cromatogramas de las fracciones 6 y 7, en donde se puede observar una gran similitud entre estos, por lo que se reunieron en una sola fracción. Así mismo se presentan los cromatogramas correspondientes a las demás fracciones reunidas en los **Anexos 10 a 26**.

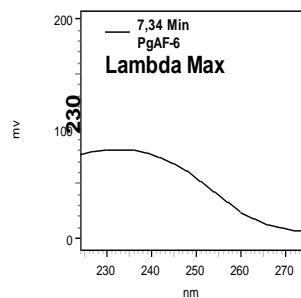
I.



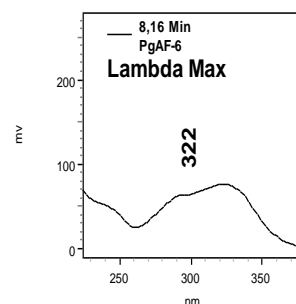
II.



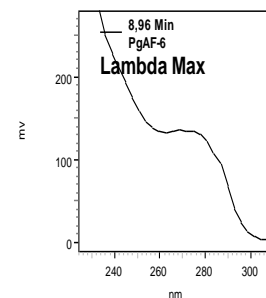
III.

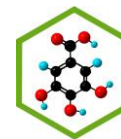


IV.

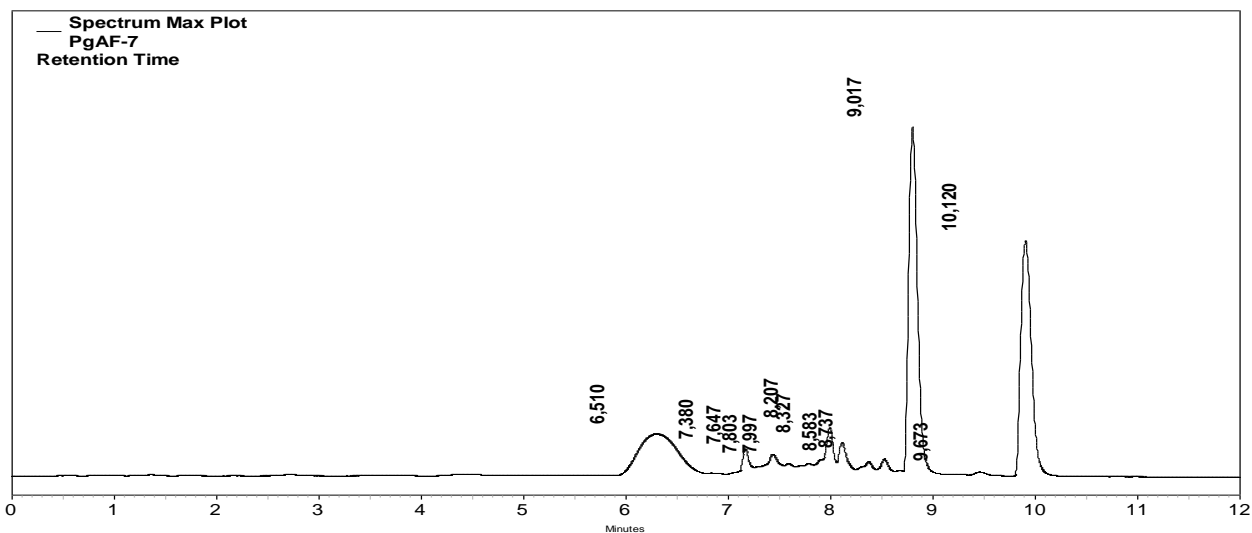


V.

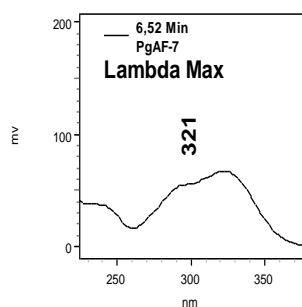




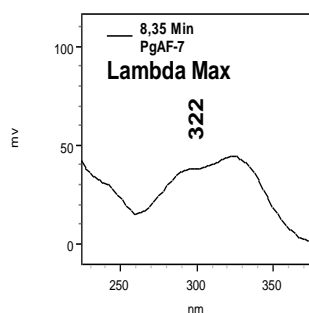
VI.



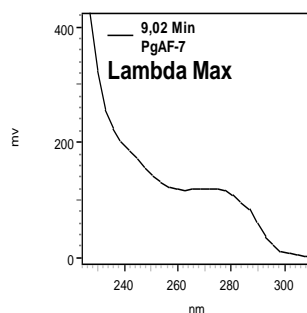
VII.



VIII.



IX.



X.

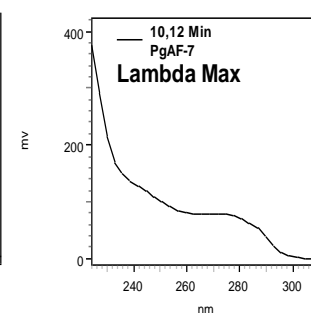


Figura 14. I. Cromatograma de PgAF-6, II. UV (TR 6,54 min), III. UV (TR 7,34 nm), IV. UV (TR 8,16 min), V. UV (TR 8,96 min), VI. Cromatograma de PgAF-7, VII. UV (TR 6,52 min), VIII. UV (TR 8,35 min), IX. UV (TR 9,02 min), X. UV (TR 10,12).

4.3. Determinación de Fenoles Totales

Se llevó a cabo con base a una curva patrón de ácido Gálico ($R^2 = 0,9983$) en un rango entre 50 a 600 ppm, las absorbancias obtenidas para cada concentración de ácido Gálico se presentan en la **Tabla 10** y a través de la ecuación presentada en la **Figura 15** se determinó la concentración de fenoles totales presentes en los diferentes extractos evaluados.

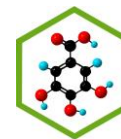


Tabla 10. Absorbancia de la curva patrón de Ácido Gálico medida a 760 nm.

Ácido Gálico (ppm)	Absorbancia			
	Promedio	SD	%CV	N
50	0,221	0,002	1,080	18
100	0,347	0,003	0,728	18
300	0,808	0,011	1,325	18
400	1,103	0,007	0,643	18
500	1,288	0,003	0,250	18
600	1,572	0,004	0,234	18

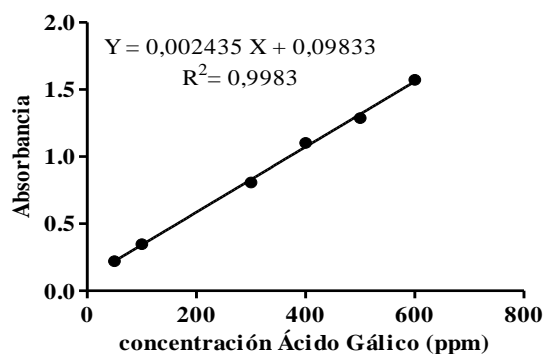
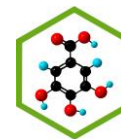


Figura 15. Curva patrón de Ácido Gálico.

Se toma la ecuación, dónde Y: Absorbancia, X: Concentración en ppm de Ácido Gálico.

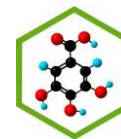
Por medio de esta ecuación y con los valores de absorbancia obtenidos para cada extracto evaluado, se obtiene la concentración de fenoles totales presentes en cada extracto, expresado como mg Ácido Gálico / g extracto seco. En la **Tabla 11** se presentan los valores obtenidos para cada extracto. Para la determinación se evaluaron los extractos obtenidos a 2000 y 4000 ppm, se realizaron 3 ensayos con 3 repeticiones cada uno.

**Tabla 11.** Resultados obtenidos en la determinación de Fenoles Totales.

Extracto Evaluado (ppm)		Absorbancia				Concentración Fenoles Totales (mg Ácido Gálico / g Extracto seco)		
		Promedio	SD	%CV	N	Promedio	SD	%CV
PgMETOH	2000	0,147	0,002	1,078	9	10,47	0,68	6,47
	4000	0,205	0,002	1,156	9			
PgHF	2000	0,088	0,001	1,271	9	0,27	0,00	0,00
	4000	0,101	0,002	2,057	9			
PgDF	2000	0,175	0,002	0,905	9	16,33	0,82	5,04
	4000	0,263	0,002	0,625	9			
PgAEF	2000	0,242	0,002	0,729	9	28,95	0,78	2,68
	4000	0,375	0,003	0,811	9			
PgAF	2000	0,314	0,005	1,459	9	43,99	0,41	0,94
	4000	0,524	0,004	0,771	9			

Estudios anteriores informan presencia de compuestos fenólicos en *Palicourea* y otras especies de la familia Rubiaceae, como por ejemplo, *Chomel obtuso*^[42], *Hebecarpa Randia*^[43], *Cruzado taurica*^[44] y *Uncaria tomentosa*^[45, 46]. Por lo que se esperaba encontrar compuestos de este tipo en la especie de estudio, como se observa en la **Tabla 11**, en donde los extractos en acetato de etilo (PgAEF) y acuoso (PgAF) registraron mayor concentración de fenoles totales que los demás extractos.

Adicionalmente se ha visto en estudios anteriores que el género *Palicourea* ha presentado potencial citotóxico en sus extractos y fracciones, se ha reportado presencia de una variedad de metabolitos secundarios para este género, incluidos los terpenos, alcaloides y cumarinas, algunos estudios relatan presencia de compuestos fenólicos en el género *Palicourea* y demás especies de la familia Rubiaceae^[36]. Lo que se evidencia en los resultados obtenidos para los extractos



evaluados, ya que contienen buena cantidad de fenoles totales y según los picos de longitud de onda de máxima absorción presentados por estos extractos se presume presencia de alcaloides, compuestos flavonoides y taninos, confirmando la presencia de estos en las pruebas de caracterización realizadas, lo que permite inferir actividad antioxidante en la especie evaluada atribuida a los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos.

Se realizó un análisis de varianza a través del software GraphPad prism 5, con el fin de observar si los resultados tenían diferencias entre cada ensayo, obteniéndose que para los extractos no hay diferencia significativa entre cada uno de los tres ensayos realizados. También se observó que no hay cambios significativos al usar el mismo extracto en los ensayos realizados en días diferentes. Lo que hace que los resultados sean confiables al ser ensayos reproducibles. Para el análisis realizado entre concentraciones de cada extracto se observa una pequeña diferencia debida posiblemente a variables no controladas como la temperatura, que dependía de la hora y el día en que se realizaba el ensayo.

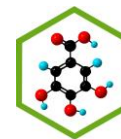
4.4. Actividad Antioxidante

4.4.1. Capacidad de captura del radical libre DPPH

Se determinó la capacidad de captura del radical libre DPPH, evaluando cada extracto y cada control a concentraciones diferentes, según la metodología explicada previamente, se realizaron 3 ensayos con 3 repeticiones cada uno. Tomando datos promedio para cada ensayo se encontró el porcentaje de inhibición para las diferentes concentraciones de cada extracto evaluado.

4.4.1.1. Controles

Como controles positivos de actividad antioxidante se emplearon el ácido ascórbico y el ácido gálico, a concentraciones diferentes con el fin de encontrar la concentración media inhibitoria de cada control necesaria para inhibir cada uno de los radicales tratados en los ensayos. Los controles fueron medidos en cada ensayo realizado y los datos obtenidos se promediaron para obtener las gráficas respectivas de cada control como se muestra a continuación.



En la **Tabla 12** se presentan los datos promedios registrados para los ensayos realizados.

Tabla 12. %Inhibición del DPPH para control.

Ácido Ascórbico (ppm)	%Inhibición de DPPH			Ácido Gálico (ppm)	%Inhibición de DPPH		
	Promedio	SD	%CV		Promedio	SD	%CV
50	17,90	0,77	4,31	50	74,079	0,297	0,400
100	29,99	0,62	2,06	100	92,342	0,273	0,296
150	39,52	0,85	2,14	150	94,151	0,195	0,207

A partir de estos valores, se grafica %Inhibición del DPPH contra Concentración de Ácido Ascórbico y %Inhibición del DPPH contra Concentración de Ácido Gálico, las gráficas se presentan en las **Figura 16 y 17**, respectivamente.

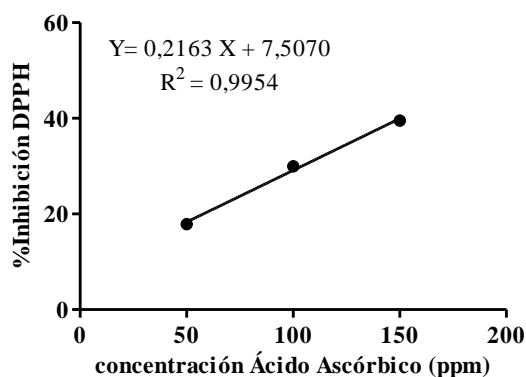


Figura 16. %Inhibición del DPPH Vs Concentración de Ácido Ascórbico.

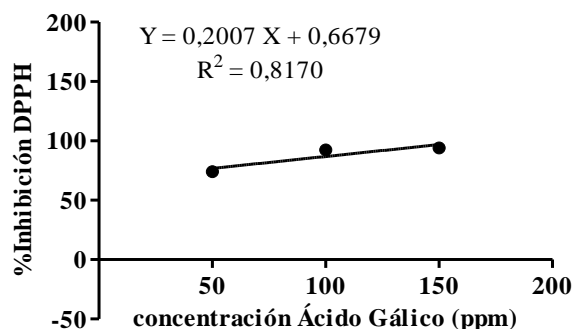
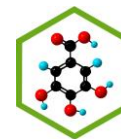


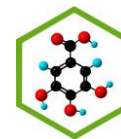
Figura 17. %Inhibición del DPPH Vs Concentración Ácido Gálico.

Con las ecuaciones obtenidas para cada control, se halla que el IC_{50} del Ácido Ascórbico es 196,5 ppm. Pero para el Ácido Gálico se observa que éste alcanza un alto porcentaje de inhibición desde concentraciones muy bajas, esto puede ser atribuido a su alto poder antioxidante, como se ha evidenciado en estudios anteriores, en donde se emplea también como control positivo de actividad y en donde se han obtenido valores de IC_{50} muy bajos para este control^[47], lo que también se puede observar en este caso, en donde los porcentajes de inhibición son tan altos, que no es posible hallar IC_{50} , ya que desde la primera concentración empleada, se inhibió más del 50% del radical DPPH, por lo que al hallar el valor del IC_{50} , este da un valor de -83,63 ppm.

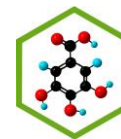
De acuerdo a referentes teóricos el ácido ascórbico y el ácido gálico son excelentes agentes antioxidantes, razón por la cual se han tomado como patrones en la evaluación de dicha actividad en estudios realizados^[47, 48].

4.4.1.2. Extractos evaluados por DPPH

Los resultados obtenidos para cada ensayo realizado al extracto PgMETOH fueron promediados como se puede observar en la **Tabla 13**. Los datos obtenidos para los demás extractos evaluados fueron tratados de la misma manera que los datos obtenidos para el extracto PgMETOH.

**Tabla 13.** Resultados registrados para el extracto PgMETOH en los ensayos con DPPH.

PgMETOH (ppm)	Absorbancia				Absorbancia blanco extracto	%Inhibición
	Promedio	SD	%CV	N		
Ensayo 1						
1000	0,517	0,001	0,224	3	0,053	5,374
1500	0,508	0,002	0,341	3	0,053	7,143
2000	0,500	0,002	0,416	3	0,053	8,708
2500	0,488	0,002	0,313	3	0,062	12,993
3000	0,485	0,001	0,119	3	0,062	13,742
3500	0,477	0,002	0,321	3	0,062	15,374
4000	0,471	0,002	0,368	3	0,071	18,367
4500	0,469	0,001	0,123	3	0,075	19,524
5000	0,454	0,002	0,758	3	0,075	22,721
Ensayo 2						
1000	0,511	0,002	0,299	3	0,051	5,223
1500	0,504	0,002	0,397	3	0,052	6,804
2000	0,498	0,004	0,803	3	0,053	8,247
2500	0,490	0,002	0,312	3	0,061	11,615
3000	0,482	0,001	0,208	3	0,061	13,196
3500	0,470	0,001	0,208	3	0,062	15,876
4000	0,461	0,001	0,377	3	0,069	19,107
4500	0,463	0,001	0,125	3	0,075	19,931
5000	0,449	0,004	0,844	3	0,075	22,955



Continuación de la **Tabla 13**.

Ensayo 3						
1000	0,511	0,002	0,339	3	0,051	5,350
1500	0,503	0,002	0,304	3	0,051	7,065
2000	0,497	0,001	0,232	3	0,055	8,985
2500	0,487	0,001	0,205	3	0,061	12,346
3000	0,482	0,001	0,208	3	0,061	13,375
3500	0,479	0,002	0,435	3	0,063	14,472
4000	0,469	0,002	0,377	3	0,069	17,696
4500	0,466	0,001	0,124	3	0,075	19,479
5000	0,449	0,003	0,576	3	0,075	23,045

El porcentaje de inhibición para cada concentración del extracto fue hallado mediante la siguiente ecuación:

$$\%inhibición\ radical\ DPPH = \left[1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_r - A_{br}} \right] * 100$$

Donde

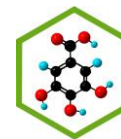
Am: Absorbancia promedio de cada extracto.

Abm: Absorbancia blanco del extracto.

Ar: Absorbancia de referencia, 0,534 0,529 y 0,530 para cada ensayo respectivamente.

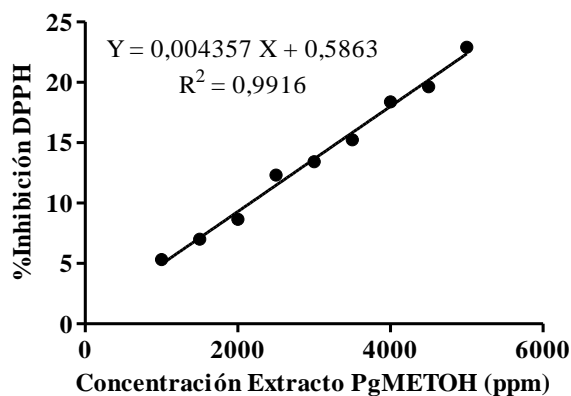
Abr: Absorbancia blanco de referencia, 0,044 para los 3 ensayos.

Posteriormente se promediaron los porcentajes de inhibición de los extractos. Los resultados obtenidos para cada extracto se presentan en la **Tabla 14**.

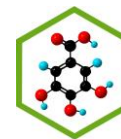
**Tabla 14.** % Inhibición del DPPH para diferentes concentraciones de cada extracto evaluado.

Extracto (ppm)	%Inhibición Extracto PgMETOH			%Inhibición Extracto PgHF			%Inhibición Extracto PgDF			%Inhibición Extracto PgAEF			%Inhibición Extracto PgAF		
	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV
1000	5,32	0,08	1,52	0,39	0,11	29,56	6,29	1,42	22,63	10,64	0,65	6,08	15,32	0,80	5,23
1500	7,00	0,18	2,53	0,47	0,55	114,89	9,23	0,69	7,49	15,97	0,90	5,64	20,22	1,19	5,88
2000	8,65	0,37	4,31	1,20	0,39	32,10	10,34	0,32	3,07	21,84	1,36	6,21	26,64	0,89	3,34
2500	12,32	0,69	5,60	2,04	0,48	23,49	11,83	1,14	9,60	27,37	1,97	7,19	32,66	0,95	2,92
3000	13,44	0,28	2,07	2,49	0,40	15,92	13,18	1,50	11,39	30,47	1,46	4,80	37,59	0,76	2,03
3500	15,24	0,71	4,67	3,27	0,84	25,74	14,57	1,38	9,50	33,73	0,64	1,90	44,82	1,09	2,43
4000	18,39	0,71	3,84	3,63	0,96	26,39	15,86	1,46	9,22	37,61	0,19	0,50	52,21	2,04	3,91
4500	19,65	0,25	1,27	4,36	1,31	29,97	17,29	1,19	6,90	44,33	2,10	4,74	-----	-----	-----
5000	22,91	0,17	0,73	5,05	1,02	20,20	18,00	0,60	3,31	47,92	2,59	5,40	-----	-----	-----

A partir de esta tabla, se graficó %Inhibición del DPPH Vs Concentración de Extracto PgMETOH (**Figura 18**).

**Figura 18.** % Inhibición del DPPH Vs Concentración Extracto PgMETOH.

Se tiene la ecuación de la recta, donde



Y: Porcentaje de inhibición del radical DPPH.

X: Concentración del extracto evaluado, en este caso PgMETOH.

Con esta ecuación se halló la concentración a la cual se alcanza el 50% de inhibición del radical DPPH, dicha concentración tiene un valor de 11342 ppm de PgMETOH.

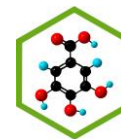
De la misma manera se trataron los datos para los demás extractos obteniéndose los resultados presentados en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Valores de IC_{50} obtenidos para cada extracto evaluado.

Extracto	R^2	IC_{50} (ppm)
PgMETOH	0,9916	11342
PgHF	0,9910	42116
PgDF	0,9846	16105
PgAEF	0,9922	5207
PgAF	0,9964	3912

Los porcentajes de inhibición obtenidos para el extracto PgHF fueron bastante bajos, teniendo que para la máxima concentración empleada se obtuvo un porcentaje de 5,05% de inhibición, razón por la cual no se considera un extracto promisorio para la actividad evaluada, ya que al hallar el IC_{50} respectivo, este da un valor de 42116, lo que indica que se necesita una concentración muy alta de este extracto para alcanzar a inhibir el radical en un 50%.

Comparando los valores obtenidos para cada uno de los extractos con los encontrados para los controles empleados, se observa que las soluciones de los extractos más promisorios PgAEF y PgAF, a 5207 ppm y 3912 ppm respectivamente, equivaldrían a una concentración en ácido Ascórbico de 196,5 ppm, lo que indica que aunque presentan una buena actividad, es necesario realizar estudios más profundos sobre los extractos evaluados, para así poder identificar las sustancias responsables del poder antioxidante de los mencionados extractos y poder incrementar su actividad al asilarlos.

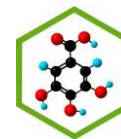


4.4.1.2.1. Fracciones Extracto PgAF

Se evaluaron también las diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso (PgAF), debido a que éste fue el extracto que presentó mayor actividad antioxidante inhibiendo al radical libre DPPH, esto se hizo con el fin de encontrar las fracciones más activas. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Resultados obtenidos para los ensayos de las fracciones del extracto PgAF.

Fracción (ppm)	%Inhibición			Fracción (ppm)	%Inhibición		
	promedio	SD	%CV		promedio	SD	%CV
PgAF-6+7				PgAF-20			
1000	20,49	0,57	2,77	1000	8,80	1,06	11,98
2000	39,06	1,05	2,70	2000	16,24	0,47	2,89
3000	65,40	0,72	1,09	3000	24,95	0,70	2,80
PgAF-8				PgAF-21			
1000	23,94	0,84	3,51	1000	11,05	0,80	7,21
2000	46,36	2,47	5,32	2000	18,25	0,77	4,19
3000	74,87	0,70	0,93	3000	27,74	0,20	0,71
PgAF-9				PgAF-22-27			
1000	27,97	0,82	2,93	1000	8,30	0,13	1,61
2000	47,12	0,59	1,24	2000	11,37	0,71	6,24
3000	73,24	0,88	1,21	3000	15,16	0,45	2,95
PgAF-10-13				PgAF-28			
1000	28,57	1,07	3,75	1000	8,19	0,94	11,51
2000	46,28	0,29	0,63	2000	12,81	0,97	7,54
3000	67,73	0,87	1,28	3000	18,91	0,08	0,41



Continuación de la **Tabla 16**.

PgAF-14+15				PgAF-29			
1000	25,01	0,66	2,64	1000	7,31	0,74	10,09
2000	42,62	0,54	1,27	2000	10,80	0,49	4,50
3000	65,66	0,52	0,79	3000	15,52	0,53	3,39
PgAF-16+17				PgAF-30+31			
1000	29,27	1,14	3,90	1000	6,75	0,52	7,70
2000	47,18	1,95	4,12	2000	10,27	0,33	3,21
3000	67,36	1,12	1,67	3000	15,16	0,48	3,17
PgAF-18				PgAF-32-34			
1000	21,83	0,46	2,12	1000	6,05	0,79	12,99
2000	36,44	0,70	1,92	2000	8,81	0,72	8,20
3000	49,24	0,18	0,37	3000	11,49	0,87	7,53
PgAF-19				PgAF-35			
1000	13,74	0,20	1,44	1000	3,56	0,151	4,247
2000	24,78	0,66	2,67	2000	5,70	0,009	0,164
3000	36,51	1,19	3,25	3000	8,11	0,052	0,636
PgAF-36-44							
Fracción (ppm)			%Inhibición				
			Promedio	SD	%CV		
1000			2,44	0,47	19,43		
2000			4,40	0,02	0,43		
3000			6,89	0,68	9,84		

Con base en estos datos se hicieron las gráficas correspondientes a cada fracción y por medio de estas se hallaron los valores de IC_{50} para cada fracción evaluada, los resultados se presentan en la **Tabla 17**.

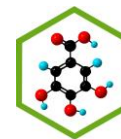
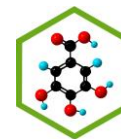


Tabla 17. Valores de IC₅₀ obtenidos para cada fracción del extracto PgAF evaluada.

Fracción	R ²	IC ₅₀ (ppm)
6+7	0,9901	2372
8	0,9953	2063
9	0,9922	2025
10-13	0,9970	2126
14+15	0,9941	2274
16+17	0,9988	2108
18	0,9985	3033
19	0,9997	4195
20	0,9979	6129
21	0,9938	5712
22-27	0,9964	13195
28	0,9938	8847
29	0,9927	11449
30+31	0,9914	11335
32-34	0,9990	17153
35	0,9989	21395
36-44	0,9955	22403

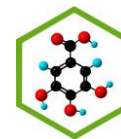
Como se puede observar en la **Tabla 17**, la mayoría de las fracciones del extracto acuoso, al igual que el extracto acuoso inicial (PgAF), presentan una gran actividad antioxidante, se tiene que las primeras fracciones son las que logran una mayor decoloración del radical DPPH, lo que evidencia un mayor poder antioxidante, ya que se necesita de una menor concentración de estas fracciones para alcanzar el 50% de inhibición del radical libre tratado. También se puede afirmar según los coeficientes de correlación, que el nivel de actividad aumenta directamente proporcional a la concentración de las fracciones evaluadas.

Además de esto, se observa que las últimas fracciones son menos activas frente al radical DPPH, esto es debido posiblemente a que en el fraccionamiento por exclusión en la columna de DIAION



HP-20, se concentraron compuestos activos en las primeras fracciones, ya que esta columna permite separar moléculas de diferentes dimensiones^[25], eluyendo primero aquellas moléculas de mayor tamaño y por ultimo aquellas que por su menor tamaño se retienen más tiempo dentro de los espacios del material de la columna^[25, 49]. Al emplear un gradiente de agua-metanol en la elusión de las fracciones, se espera que además de eluir por tamaño, se separen también por polaridad, ya que ésta va disminuyendo gradualmente a medida que se va variando de agua a metanol durante la elusión. Según esto se podría presumir que de los posibles compuestos presentes en el extracto acuoso, eluirían primero los taninos, antocianinas y flavonoides debido a la cantidad de OH presentes en las estructuras que le otorgan mayor polaridad a estos compuestos, seguido de los alcaloides y por ultimo eluirían compuestos de bajo peso molecular que no se consideran de interés debido a la baja actividad presentada por las ultimas fracciones evaluadas. Según esto se puede inferir que estos compuestos activos que eluyeron primero se concentraron en las primeras fracciones lo cual incrementó considerablemente la actividad de estas, comparada con la actividad exhibida por el extracto acuoso original (PgAF).

Según esto y con base en los resultados reportados previamente en la **Tabla 16** se puede afirmar que los extractos en acetato de etilo (PgAEF) y el extracto acuoso (PgAF) presentaron mayor poder antioxidante al llevar a cabo el estudio, con un IC₅₀ de 5207 ppm y 3912 ppm respectivamente. Según esto de los extractos evaluados, el más activo es el extracto acuoso (PgAF), debido a que necesita de una concentración más baja de extracto para lograr inhibir del radical DPPH en un 50%. Además de esto, se evaluaron también las fracciones obtenidas a partir del extracto más activo (PgAF) y como se reportó en la **Tabla 17**, se tiene que las fracciones de la PgAF-6+7 a la PgAF-18, son las que logran mayor decoloración del radical DPPH, lo que indica que estas fracciones son las responsables de la actividad antioxidante presentada por el extracto acuoso como tal, que al ser fraccionado concentró compuestos activos en las primeras fracciones, lo que se ve evidenciado en algunas de éstas, con valores de IC₅₀ de 2063 ppm (PgAF-8) y 2025 ppm (PgAF-9), que como se observa, son concentraciones más bajas que el valor hallado para el extracto acuoso inicial (3912 ppm).



4.4.2. Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS•+)

Se llevó a cabo la determinación de la actividad inhibidora del catión radical ABTS, evaluando cada uno de los extractos obtenidos y los controles a concentraciones diferentes, según la metodología explicada previamente, se realizaron 3 ensayos con 3 repeticiones cada uno.

Así como para los datos obtenidos del ensayo con el radical DPPH, se tomaron los datos promedio para cada ensayo y con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición para las diferentes concentraciones de cada extracto evaluado, obteniéndose así los resultados para cada extracto como se muestra a continuación.

4.4.2.1. Controles

Los datos registrados para los controles se trataron de igual manera que los datos reportados para los ensayos con el radical DPPH. Los porcentajes de inhibición de cada control se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. %Inhibición del ABTS para cada control.

Ácido Ascórbico (ppm)	%Inhibición de DPPH			Ácido Gálico (ppm)	%Inhibición de DPPH		
	Promedio	SD	%CV		Promedio	SD	%CV
50	28,91	1,40	4,86	50	99,66	0,08	0,08
100	44,09	1,43	3,23	100	99,73	0,10	0,10
150	70,95	1,44	2,03	150	99,85	0,08	0,08

A partir de estos valores, se grafican %Inhibición del ABTS contra Concentración de Ácido Ascórbico y %Inhibición del ABTS contra Concentración de Ácido Gálico, las gráficas se presentan en las **Figura 19 y 20**.

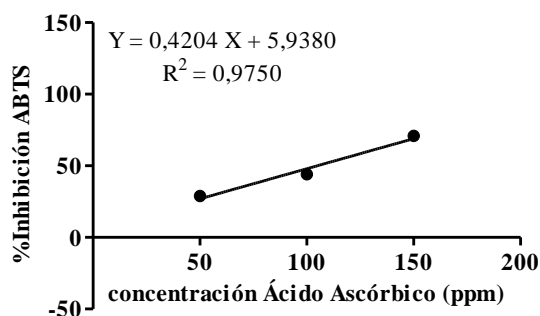
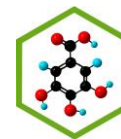


Figura 19. %Inhibición del ABTS Vs Concentración de Ácido Ascórbico.

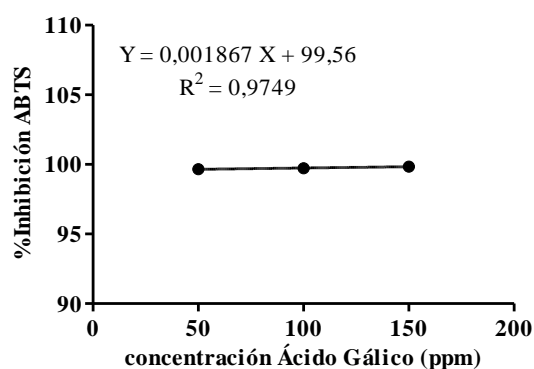
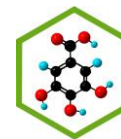


Figura 20. %Inhibición del ABTS Vs Concentración Ácido Gálico.

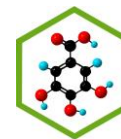
Con las ecuaciones obtenidas para cada control, se halla que el IC_{50} del Ácido Ascórbico es 104,8 ppm. Mientras que para el ácido gálico al igual que para el método de DPPH, se observa que alcanza altos porcentajes de inhibición desde concentraciones bajas, atribuido posiblemente a su alto poder antioxidante. Al tener tan altos porcentajes de inhibición no es posible hallar IC_{50} para este método.

4.4.2.2. Extracto PgMETOH

Los resultados obtenidos para cada ensayo realizado al extracto PgMETOH se promediaron como se puede observar en la **Tabla 19**. Los datos obtenidos para los demás extractos evaluados fueron tratados de la misma manera que los datos obtenidos para el extracto PgMETOH.

**Tabla 19.** Resultados registrados para el extracto PgMETOH en los ensayos con ABTS.

PgMETOH (ppm)	Absorbancia			Absorbancia blanco extracto	%Inhibición
	Promedio	SD	%CV		
Ensayo 1					
1000	0,431	0,002	0,472	0,053	5,374
1500	0,359	0,003	0,737	0,053	7,143
2000	0,274	0,003	1,095	0,053	8,708
2500	0,196	0,005	2,297	0,062	12,993
3000	0,141	0,004	2,120	0,062	13,742
3500	0,115	0,003	1,860	0,062	15,374
4000	0,083	0,001	0,559	0,071	18,367
Ensayo 2					
1000	0,406	0,003	0,652	0,051	5,223
1500	0,336	0,001	0,172	0,052	6,804
2000	0,246	0,002	0,704	0,053	8,247
2500	0,177	0,001	0,327	0,061	11,615
3000	0,136	0,001	0,735	0,061	13,196
3500	0,098	0,005	5,219	0,062	15,876
4000	0,078	0,004	0,784	0,069	19,107
Ensayo 3					
1000	0,375	0,003	1,566	0,051	5,350
1500	0,313	0,003	1,099	0,051	7,065
2000	0,234	0,004	2,180	0,055	8,985
2500	0,168	0,001	0,848	0,061	12,346
3000	0,123	0,001	1,870	0,061	13,375
3500	0,094	0,001	4,522	0,063	14,472
4000	0,075	0,001	0,766	0,069	17,696



El porcentaje de inhibición fue hallado mediante la siguiente ecuación:

$$\%inhibición\ radical\ ABTS = \left[1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_r - A_{br}} \right] * 100$$

Donde

Am: Absorbancia promedio de cada extracto.

Abm: Absorbancia blanco del extracto.

Ar: Absorbancia de referencia, 0,640 0,609 y 0,553 para cada ensayo respectivamente.

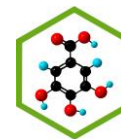
Abr: Absorbancia blanco de referencia, 0,051 0,050 y 0,051 para cada ensayo respectivamente.

Se promediaron los porcentajes de inhibición del ABTS presentados por el extracto PgMETOH.

Los resultados obtenidos para cada extracto se presentan en la **Tabla 20**.

Tabla 20. %Inhibición del ABTS para diferentes concentraciones de cada extracto evaluado.

Extracto (ppm)	%Inhibición Extracto PgMETOH			%Inhibición Extracto PgHF			%Inhibición Extracto PgDF			%Inhibición Extracto PgAEF			%Inhibición Extracto PgAF		
	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV	Promedio	SD	%CV
1000	36,68	0,31	0,84	4,48	0,73	16,30	54,33	0,20	0,36	64,91	1,59	2,46	91,54	0,45	0,50
1500	49,43	0,83	1,68	7,69	0,51	6,57	81,33	0,82	1,01	76,40	1,28	1,68	99,72	0,11	0,11
2000	65,45	1,54	2,35	10,63	0,99	9,33	92,26	0,30	0,32	94,97	0,84	0,88	99,73	0,08	0,08
2500	78,65	1,13	1,44	13,63	0,96	7,04	97,83	0,08	0,08	99,69	0,11	0,11	99,75	0,05	0,05
3000	87,73	1,03	1,17	14,50	0,69	4,76	99,68	0,19	0,19	99,83	0,11	0,11	99,81	0,04	0,04
3500	94,25	1,71	1,81	21,97	0,42	1,92	99,72	0,11	0,11	99,90	0,03	0,03	99,83	0,01	0,01
4000	98,93	0,87	0,88	23,96	0,98	4,10	99,81	0,07	0,07	99,92	0,03	0,03	99,90	0,04	0,03
4500	----	----	----	25,57	0,78	3,04	99,89	0,04	0,04	99,94	0,00	0,00	-----	-----	-----
5000	----	----	----	30,86	0,39	1,25	99,94	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	-----	-----	-----



En la **Figura 21**, Se puede observar la ecuación que relaciona el porcentaje de inhibición del ABTS con la concentración del extracto evaluado (PgMETOH) por medio de la cual se obtiene el valor en el cual se alcanza un 50% de inhibición del radical ABTS.

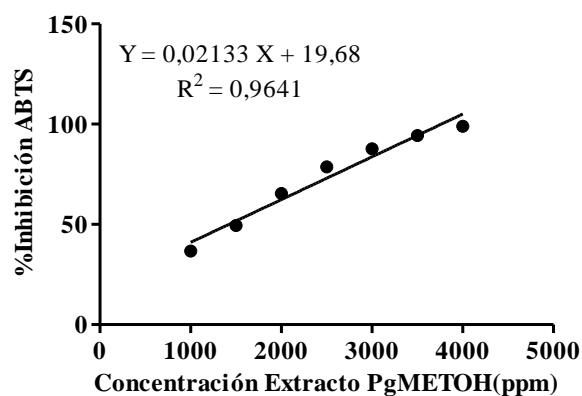


Figura 21. % Inhibición del ABTS Vs Concentración Extracto PgMETOH.

Donde

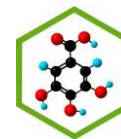
Y: Porcentaje de inhibición del radical ABTS.

X: Concentración del extracto evaluado, en este caso PgMETOH.

Se obtiene un IC_{50} de 1421 ppm de PgMETOH. De la misma manera se trataron los datos para los demás extractos obteniéndose los resultados presentados en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Valores de IC_{50} obtenidos para cada extracto evaluado por ABTS.

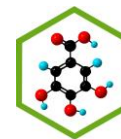
Extracto	R^2	IC_{50} (ppm)
PgMETOH	0,9641	1421
PgHF	0,9603	8279
PgDF	0,9436	816
PgAEF	0,9577	367
PgAF	0,9523	-826900



Para los extractos PgDF, PgAEF y PgAF, el porcentaje de inhibición aumentó sin proporción entre cada una de las concentraciones evaluada, por lo que fue necesario seleccionar un trayecto de la curva en donde se presentó linealidad para poder hallar el IC_{50} respectivo.

En general los resultados obtenidos permiten observar que para alcanzar una inhibición del radical ABTS del 50%, es necesaria una concentración de extracto más baja que las concentraciones necesarias para inhibir el 50% del radical DPPH, sin embargo, la técnica del ABTS no permite discriminar extractos que contienen buenos compuestos antioxidantes como la gran mayoría de técnicas; esto se debe a la estabilidad del reactivo $ABTS^{*+}$, una estructura completamente plana que reacciona fácilmente con reductores mediante un mecanismo SET y(o) $HAT^{[50]}$, lo anterior se ve reflejado en la correlación entre %Inhibición del DPPH Vs %Inhibición del $ABTS^{*+}$ ($R^2=0,9600$, $R^2=0,8348$ y $R^2=0,6939$ para concentraciones de extracto 1000, 1500 y 2000 ppm respectivamente), como se mostrará más adelante, lo que hace que los ensayos con el ABTS sean poco confiables y de baja reproducibilidad, por lo que no es recomendable realizarlos sin otro método de captura de electrones, con el cual se pueda corroborar los resultados obtenidos. En el presente trabajo, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante a través de dos métodos de captura de electrones, mencionados a lo largo del mismo, con lo que se corrobora el nivel de actividad de cada extracto.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para los controles empleados, se tiene que las concentraciones necesarias de los extractos más promisorios (PgAEF y PgAF) equivaldrían a una concentración de 104,8 ppm de ácido ascórbico, en cuanto a actividad antioxidante se refiere, por lo que se hace necesario seguir estudiando los extractos, para así encontrar los compuestos responsables de la actividad, y aislarlos para incrementar así su poder antioxidante.



4.5. Comparación de los resultados obtenidos a través de los diferentes métodos empleados

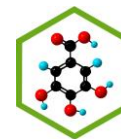
A continuación se presenta en la **Tabla 22**, un resumen de los resultados obtenidos a través de los diferentes métodos llevados a cabo a lo largo de la investigación.

Tabla 22. Resultados obtenidos para cada ensayo realizado a los extractos evaluados.

Extracto Evaluado	IC ₅₀ Método DPPH (ppm)	IC ₅₀ Método ABTS (ppm)	Concentración Fenoles Totales (mg Ácido Gálico / g extracto seco)
PgMETOH	11342	1421	10,47
PgHF	42116	8279	0,27
PgDF	16105	816	16,33
PgAEF	5207	367	28,95
PgAF	3912	-826900	43,99
Ácido ascórbico	196,5	104,8	---
Ácido gálico	-83,63	-26545,2598	---

Como se observa en la **Tabla 22**, se evidencia que los resultados obtenidos a través de ambos métodos de captura de electrones (DPPH y ABTS), corroboran el nivel de actividad que presenta cada extracto, ya que de ambos métodos se obtienen los mismos resultados en cuanto a nivel de actividad, siendo el extracto en *n*-hexano (PgHF) el menos activo, y siendo los extractos en acetato de etilo (PgAEF) y en agua (PgAF), los extractos con mayor actividad antioxidante.

Según la literatura^[36], el contenido de fenoles totales y el potencial antioxidante encontrado en los extractos puede ser útil para promover una mayor investigación y correlacionar esta actividad con otras importantes, como por ejemplo, la actividad antiinflamatoria, que está relacionada con otras especies del género *Palicourea*. Varios estudios sugieren una correlación entre la actividad antioxidante y antiinflamatoria, es decir, algunos extractos de hierbas reducen la inflamación



mediante la eliminación de superóxido que participa en el reclutamiento de células polimorfonucleares presentes en los tejidos inflamados^[36, 51].

Los resultados presentados para los métodos de captura de electrones concuerdan con los obtenidos en la determinación de fenoles totales presentes en cada extracto, lo que permite afirmar que la actividad antioxidante exhibida por cada uno de los extractos evaluados en el presente trabajo, está relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos que cada uno de éstos posee. Aunque no es posible deducir con precisión cuáles son los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los extractos promisorios, se sabe que los flavonoides son en parte responsables de esta actividad, teniendo en cuenta los numerosos estudios que reportan las diferentes actividades que presentan esta clase de compuestos, que son los principales descritos como potentes antioxidantes^[36-40].

A partir de los resultados obtenidos, se graficó %Inhibición de DPPH contra Concentración de Fenoles Totales, así como también %Inhibición de ABTS contra Concentración de Fenoles Totales y %Inhibición de DPPH contra %Inhibición de ABTS. Las gráficas se observan en las Figuras 22, 23, 24 y 25 respectivamente.

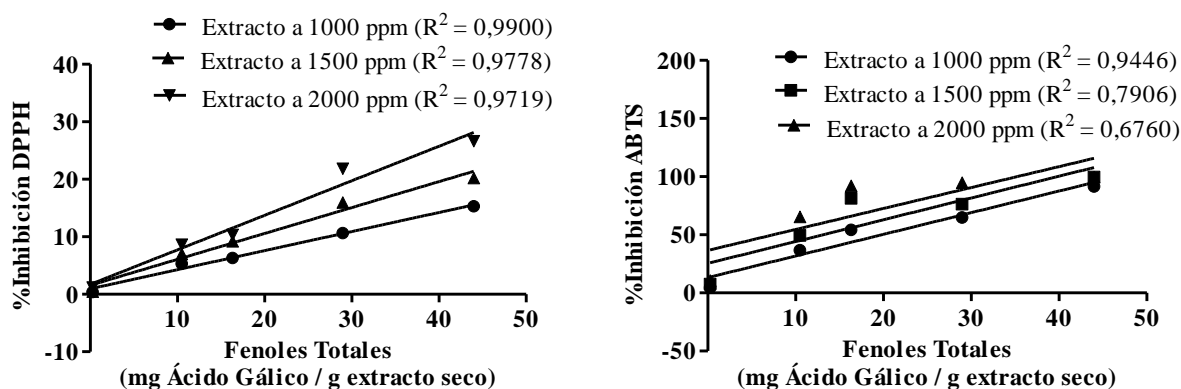


Figura 22. %Inhibición DPPH Vs Concentración Fenoles Totales y %Inhibición ABTS Vs Concentración de Fenoles Totales.

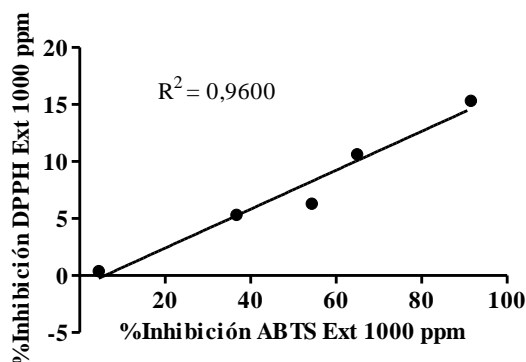
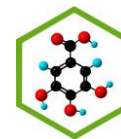


Figura 23. %Inhibición DPPH Vs %Inhibición ABTS (1000ppm).

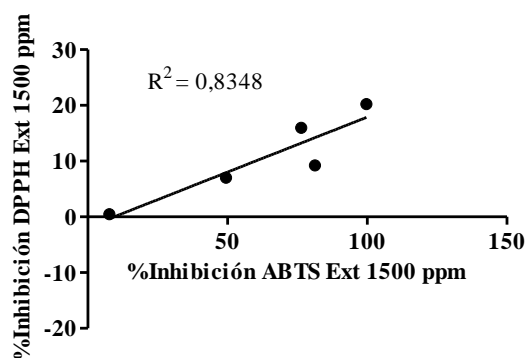


Figura 24. %Inhibición DPPH Vs %Inhibición ABTS (1500ppm).

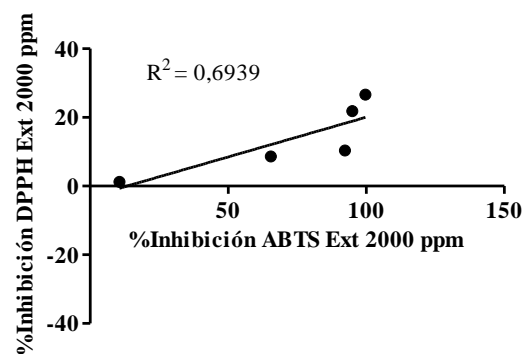
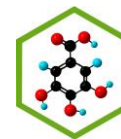


Figura 25. %Inhibición DPPH Vs %Inhibición ABTS (2000ppm).

De estos coeficientes de correlación se puede concluir que hay una conexión directa entre la concentración de fenoles totales presentes en cada extracto y la actividad evidenciada por cada uno de éstos mediante los diferentes métodos de captura de electrones empleados en el presente

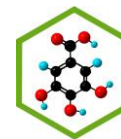


trabajo. También se puede observar que en los coeficientes correspondientes al %Inhibición de ABTS Vs Concentración de Fenoles Totales se obtiene mayor linealidad en el extracto de más baja concentración (1000 ppm), mientras que en los otros dos coeficientes correspondientes a 1500 y 2000 ppm, se observa una disminución de la linealidad, sin embargo al realizar una un análisis de residuales sobre estas tres curvas se observa que los datos están conservan una correlación entre sí.

En los coeficientes correspondientes a %Inhibición de DPPH Vs %Inhibición de ABTS se observa una disminución de la linealidad al aumentar la concentración de los extractos pero a pesar de esto, se puede observar que existe una relación entre ambos métodos de captura de electrones, lo que se ve evidenciado en los resultados obtenidos, en donde se corrobora por ambos métodos el nivel de actividad de cada extracto evaluado, teniendo como extractos más activos los extractos en acetato de etilo (PgAEF) y acuoso (PgAF).

El método DPPH presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS, por ejemplo, tiene que ser generado tras una reacción química con el persulfato de potasio^[52], lo que puede influir sobre su estabilidad y posteriores resultados, ya que dependería de la reacción previa al uso del ABTS.

Se realizó un análisis de varianza entre los resultados obtenidos para cada método empleado, en donde se observó diferencias significativas entre el método del DPPH y el del ABTS, debido probablemente a las condiciones en que se llevaron a cabo cada uno de los ensayos, en donde el ensayo se pudo ver afectado por la temperatura por ejemplo, que depende de la hora y el día en que se lleve a cabo el análisis. Las diferencias también se pueden deber a la estabilidad de los radicales empleados, ya que el ABTS por ejemplo depende en gran medida de la reacción previa al análisis, en donde se forma el catión radical ABTS reaccionando con un agente oxidante como el persulfato de potasio.



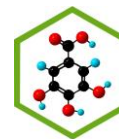
5. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae), que hasta el momento ha sido poco estudiada, es el más activo, ya que presentó mayor capacidad antioxidante a través de los métodos de captura de electrones empleados. El fraccionamiento de este extracto permitió concentrar los compuestos responsables de dicha actividad en las primeras fracciones, en las que se observó un mejor comportamiento frente al radical libre empleado.

La especie *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) puede ser fuente importante de metabolitos con capacidad antioxidante y por esta razón debe ser motivo de estudio profundo para aislar e identificar las sustancias responsables de dicha actividad. Ya que puede ser considerada fuente natural de antioxidantes con potencial aplicación en alimentos y/o en la industria farmacéutica, debido a la actividad encontrada en dos de los extractos (PgAEF y PgAF) evaluados bajos los dos métodos de captura de electrones (DPPH y ABTS). En general se observa que el efecto antiradical aumenta conforme aumenta la concentración de extracto evaluado.

De la determinación de fenoles totales se puede concluir que la cantidad de fenoles encontrada en los extractos obtenidos está directamente relacionada con la actividad antioxidante exhibida por cada extracto, por lo que se puede afirmar que la presencia de dichos compuestos definen enormemente la capacidad o poder antioxidante de los extractos evaluados. Así mismo, se observa que en extractos obtenidos mediante solventes no polares como n-hexano, la concentración de fenoles es considerablemente más baja que en otros extractos, lo que se ve reflejado en la baja actividad mostrada por este extracto.

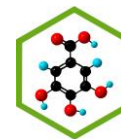
En general los resultados obtenidos dan un indicio sobre la posibilidad de utilizar la especie *Palicourea guianensis* (Rubiaceae), como planta promisoría para el aislamiento de sustancias fenólicas con actividad antioxidante.



6. RECOMENDACIONES

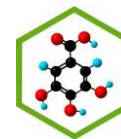
Es recomendable realizar estudios más profundos a través de otros métodos adicionales sobre el extracto más activo, ya que se evidencio un aumento de la actividad al fraccionar dicho extracto, por lo que sería interesante tratar las fracciones y emplear técnicas de aislamiento e identificación estructural de los principios activos presentes en los extractos evaluados que son responsables de la actividad exhibida por éstos.

Puede ser útil promover una mayor investigación para relacionar la actividad antioxidante y la cantidad de fenoles totales con otras actividades importantes, como por ejemplo, la actividad antiinflamatoria, que está relacionada con otras especies del género *Palicourea*, ya que en otros estudios sugieren una correlación entre la actividad antioxidante y antiinflamatoria, donde algunos extractos de hierbas reducen la inflamación mediante la eliminación de superóxido que participa en el reclutamiento de células polimorfonucleares presentes en los tejidos inflamados^[36, 51].

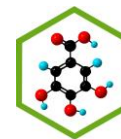


BIBLIOGRAFÍA

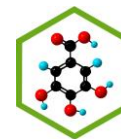
- [1.] Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T. y Terao J. *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 1998. **62**(6): 1201-1204.
- [2.] Celis Á., Mendoza C., Pachón M., Cardona J., Delgado W. y Cuca L.E. *Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión*. Agronomía Colombiana. 2008. **26**(1): 97-106.
- [3.] Sánchez P.E. *Flórula del Parque Nacional Cahuita*. 2000: Editorial universidad estatal a distancia, EUNED. 5-343.
- [4.] Mendoza H., Ramírez B.R. y Jiménez L.C. *Rubiaceae de Colombia, Guía ilustrada de géneros*. 2004, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt: Bogotá, Colombia. 1-48.
- [5.] Niño J., Narváez D.M., Mosquera O.M. y Correa Y.M. *Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two rubiaceae plants from Colombian biodiversity*. Brazilian Journal of Microbiology. 2006. **37**: 566-570.
- [6.] Suffredini I.B., Barradas M.L., Varella A.D. y Younes R.N. *Antibacterial Activity of Brazilian Amazon Plant Extracts*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2006. **10**: 400-402.
- [7.] Leiva-Daniel D.E. *Determinación de antiocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora, en Química y taller de procesamiento de alimentos*. 2009, Universidad Tecnológica de la Mixteca: México. 1-69.
- [8.] Rivero-Rosales A. y Betancort-Rodríguez J.R. *Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas*. 2006, Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- [9.] Mosquera O.M., Niño J., Correa Y.M. y Buitrago D.C. *Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales*. Scientia et Technica Año XI. 2005. **27**: 231-234.
- [10.] Ugartondo-Casadevall V. *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares, en Departamento de Fisiología*. 2009, Universitat de Barcelona: Barcelona. 1-216.



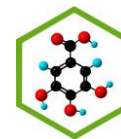
- [11.] Cuevas-Montilla E., Antezana A. y Winterhalter P. *Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (Zea Mays) Boliviano*. 2008, Universidad Mayor San Simón Cochabamba: Sucre a Parque la Torre, Cochabamba, Bolivia. 79-95.
- [12.] Muñoz-Muñoz I.M. y Soto-Rojas V.E. *Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de VITIS vinifera en aortas de ratas sometidas a estrés oxidativo*, en *Facultad de Medicina, Escuela de Kinesiología*. 2005, Universidad de Chile: Chile. 1-37.
- [13.] Pietta P.-G. *Flavonoids as Antioxidants*. Journal of Natural Products. 2000. **63**(7): 1035-1042.
- [14.] Garzón G.A. *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión*. Acta Biológica Colombiana. 2008. **13**(3): 27-36.
- [15.] Mazza G. y Brouillard R. *Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products*. Journal Chemistry. 2001. **25**: 207-225.
- [16.] Isaza-M J.H. *Taninos o polifenoles vegetales*. Scientia et Technica. 2007. **33**: 13-18.
- [17.] García-Mier L. *Contenido total de taninos condensados en las variedades Pinto Zapata, Azufrado Higuera, Negro 8025 y Bayo Madero de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) cocidas por calentamiento óhmico*, en *Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada*. 2009, Instituto Politécnico Nacional: Santiago de Querétaro. 1-56.
- [18.] Inocente-Camones M.Á. *Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de Triplaris americana L. (Tangarana colorada)*, en *Facultad de Farmacia y Bioquímica*. 2009, Universidad Nacional Mayor De San Marcos: Lima, Perú. 114.
- [19.] Fernández-Pachón M.S., Villaño D., Troncoso A.M. y García-Parrilla M.C. *Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo*. Sociedad Latinoamericana de Nutrición, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla. España. 2006. **56**(2).
- [20.] Permady H.H. *Determinación de la actividad antioxidante, antimutagénica, anticarcinogénica de Heterantha y Ditaxina presente en azafran de bolita (Ditaxis heterantha Zucc)*, en *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 2008, Instituto Politécnico Nacional: México DF. 1-74.
- [21.] Castañeda C.B., Ramos L.E. y Ibáñez V.L. *Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*. Revista Horizonte Médico. 2008. **8**(1): 56-72.



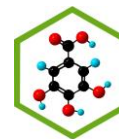
- [22.] Kuskoski E.M., Asuero A.G., Troncoso A.M., García-Parilla M.C. y Fett R. *Actividad antioxidante de pigmentos antiocianicos*. Bras. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 2004. **24**(4): 691-693.
- [23.] Burneo-Palacios Z.L. *Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador*, en *Escuela de Ingeniería Química*. 2009, Universidad Técnica Particular De Loja: Loja Ecuador. 64.
- [24.] Gómez-Ullate R. y Serrano-Álvarez A. *Cromatografía: Principios y aplicaciones*. Marzo 19 de 2011, 2:00 pm; disponible en: <http://www.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>.
- [25.] Vera-Saltos M.B. *Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: Ambrosia arborescens* en *Departamento de ciencias de la vida Ingeniería en Biotecnología*. 2008, Escuela Politécnica del Ejército: Sangolquí. 119.
- [26.] Mendoza-Cifuentes H. *Las Especies de Rubiaceae del Flanco Oriental de la Cordillera Oriental, Norte de Los Andes, Colombia*. Biota Colombiana. 2000. **1**(2): 224-229.
- [27.] Teran-Aguilar J.J. *Diversidad de la familia Rubiaceae en el Parque Nacional Carrasco (Limbo Palmar y Guacharos)*, en *Facultad de Ciencias y Tecnología*. 2006, Universidad Mayor de San Simón: Cochabamba, Bolivia. 1-104.
- [28.] Agudelo Ramirez C. y Escobar Dávila L.M. *Actividad alelopática en maceta del extracto isopropanol-agua (65:35) de Miconia caudata (Melastomataceae)*, en *Facultad de Tecnología, Escuela de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira*. 1-113.
- [29.] Domínguez X. *Métodos de identificación fitoquímica*. Primera edición ed. 1973, México: LIMUSA.
- [30.] Martínez A., Valencia G.A., Jiménez N., Mesa M. y Galeano E. *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*, en *Facultad de Química Farmacéutica, Departamento de Farmacia*. 2008, Universidad de Antioquia: Medellín. 1-96.
- [31.] Alvarez E., Jimenez O.J., Posada C.M., Rojano B.A., Gil J.H., Garcia C.M. y Durango D.L. *Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género Vismia (guttiferae)*. Vitae. 2008. **15**(1): 165-172.
- [32.] Singleton V.L., Orthofer R. y Lamuela-Raventos R.M. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu Reagent*. Methods Enzymol. 1999. **299**: 152-178.
- [33.] Brand-Williams W., Cuvelier M. y Berset C. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensmittel-Wissenchaft Und Technologie. 1995. **28**: 25-30.



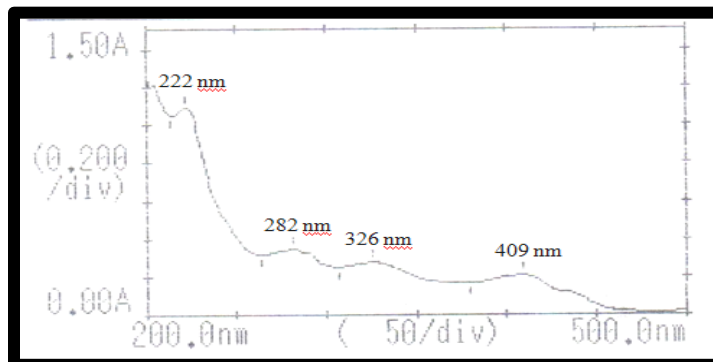
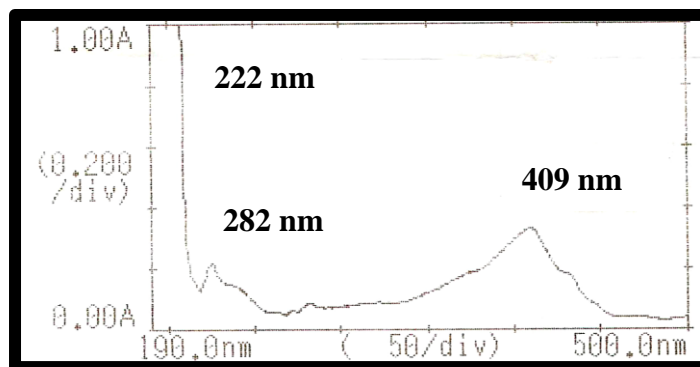
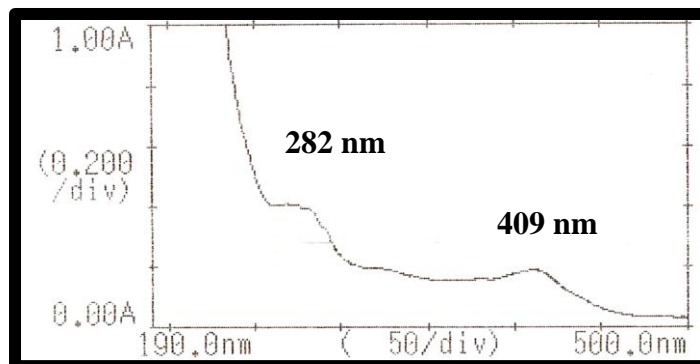
- [34.] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine. 1999. **26**(9): 1231-1237.
- [35.] Arias C.M. y Marulanda J. *Estandarización y aplicación de un método espectrofluorométrico para la identificación de inhibidores de la proteasa aspártica secretada (SAP) de *Cándida albicans*, a partir de extractos de plantas de la familia Melastomataceae y Rubiaceae*, en Facultad de Tecnología - Escuela de Química. 2010, Universidad Tecnológica de Pereira. 94.
- [36.] da-Rosa E.A., e-Silva B.C., da-Silva F.M., Tanaka C.M.A., Peralta R.M., de-Oliveira C.M.A., Kato L., Ferreira H.D. y da-Silva C.C. *Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2010. **20**(4): 484-488.
- [37.] Alves C.Q., Brandão H.N., David J.M., David J.P. y Lima L.S. *Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides*. Diálogos & Ciência. 2007. **5**(12): 1-8.
- [38.] Furusawa M., Tanaka T., Ito T., Nishikawa A., Yamasaki N., Nakaya K., Matssura N., Tsuchiya H., Nagayama M. y Iinuma M. *Antioxidant activity of hydroxyflavonoid*. Journal of Health Science. 2005. **51**(3): 376-378.
- [39.] Suzgeç S., Meriçli A.H., Houghton P.J. y Çubukçu B. *Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity*. Fitoterapia. 2005. **76**: 269-272.
- [40.] Cioffi G., D'Auria M., Braca A., Mendez J., Castillo A., Morelli I., De-Simone F. y De-Tommasi N. *Antioxidant and freeradical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata**. Journal of Natural Products. 2002. **65**: 1526-1529.
- [41.] Cruz-Antonio F.V., Saucedo-Pompa S., Martínez-Vásquez G., Aguilera A., Rodríguez R. y Aguilar C.N. *Propiedades químicas e industriales del ácido elágico*. Revista Científica De La Universidad Autónoma de Coahuila. 2010. **2**(3).
- [42.] Barros M.P., Santin S.M.O., Da-Costa W.F., Vidotti G.J., Sarragiotto M.H., Souza M.C. y Bersani-Amado C.A. *Constituintes químicos e avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante de extratos das folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae)*. Química Nova. 2008. **31**(8): 1987-1989.
- [43.] Nazari A.S., Dias S.A., Da-Costa W.F., Bersani-Amado C.A., Vidotti G.J., De-Souza M.C. y Sarragiotto M.H. *Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Randia hebecarpa* and major constituents*. Pharmaceutical Biology. 2006. **44**(1): 7-9.

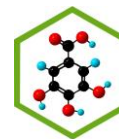


- [44.] Mavi A., Terzi Z., Ozgen U., Yildirim A. y Coskun M. *Antioxidant properties of some medicinal plants: Prangos ferulacea (Apiaceae), Sedum sempervivoides (Crassulaceae), Malva neglecta (Malvaceae), Cruaciata taurica (Rubiaceae), Rosa pimpinellifolia (Rosaceae), Galium verum subsp. verum (Rubiaceae), Urtica dióica (Urticaceae).* Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2004. **27**: 702-705.
- [45.] Ostrakhovich G.A., Mikhal'chik E.V., Getmanskaya N.V. y Durnev A.D. *Antioxidant activity of the extract from Uncaria tomentosa.* Pharmaceutical Chemistry Journal. 1997. **31**(6): 326-329.
- [46.] Pilarski R., Zielinski H., Ciestolka D. y Gulewicz K. *Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of Uncaria tomentosa.* Journal of Ethnopharmacology. 2006. **104**: 18-23.
- [47.] Sousa C.M.d.M., Rocha-e-Silva H., Magela-Vieira-Jr. G., Ayres M.C.C., S.-da-Costa C.L., Sérvulo-Araújo D., Cavalcante L.C.D., Barros E.D.S., Araújo P.B.d.M., Brandão M.S. y Chaves M.H. *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.* Química Nova. 2007. **30**(2): 351-355.
- [48.] Andrade C.A.d., Costa C.K., Bora K., Miguel M.D., Gomes O. y Kerber V.A. *Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de Acacia podalyriifolia A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae.* Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007. **17**(2): 231-235.
- [49.] Caballero J.L., Muñoz J. y Moyano E. *Cromatografía de filtración en gel.* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. 14071-Córdoba Julio 21 de 2011, 10:00 am; disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/13%20FILTRACI%C3%93N%20EN%20GEL.pdf>.
- [50.] Mesa-Vanegas A.M., Gaviria C.A., Cardona F., Sáez-Vega J.A., Trujillo S.B. y Rojano B.A. *Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género Calophyllum.* Laboratorio de Ciencias de los Alimentos. Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín 2009 Julio 14 de 2011, 4:30 pm; disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol_15_2_10/pla03210.htm.
- [51.] Thambi P.T., Kuzhivelil B., Sabu M.C. y Jolly C.I. *Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of Tabernaemontana coronaria (L) R. Br.* Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006. **68**(3): 352-355.
- [52.] Ramos-Llica E., Castañeda B.C. y Ibáñez-Vásquez L.A. *Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas.* Revista de la Academia Peruana de Salud. 2008. **15**(1): 42-46.

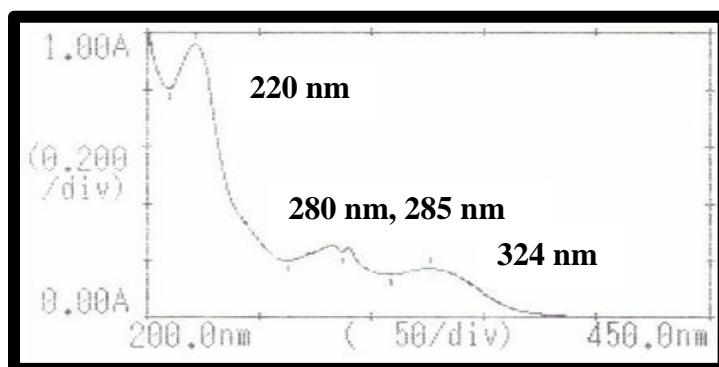


ANEXOS

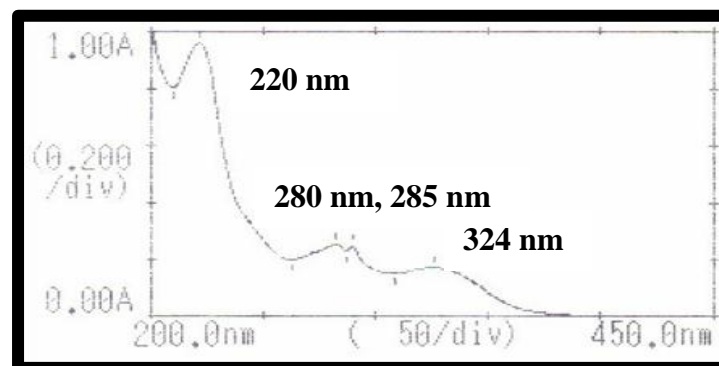
Anexo 1. Espectro UV para el extracto PgMETOH.**Anexo 2.** Espectro UV del Extracto PgHF.**Anexo 3.** Espectro UV de PgDF.

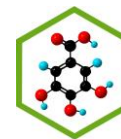
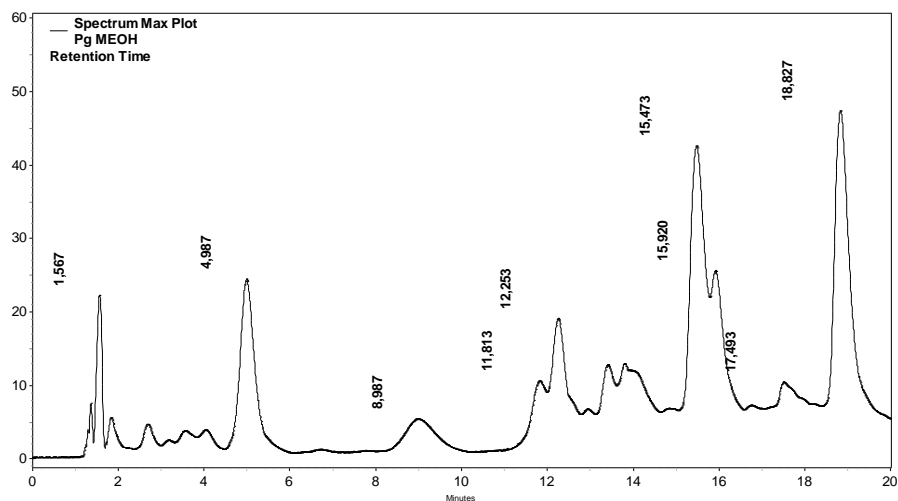
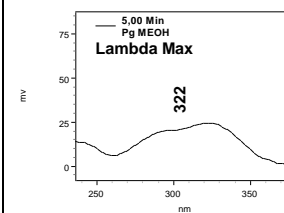
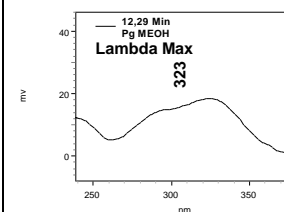
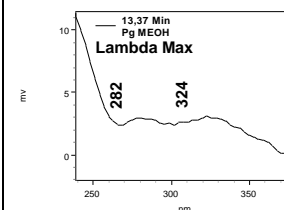
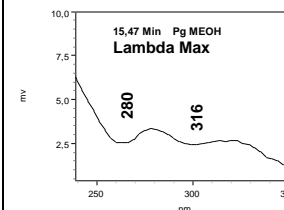


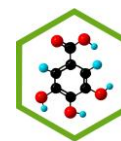
Anexo 4. Espectro UV de PgAEF.



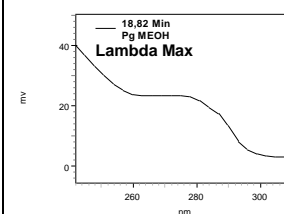
Anexo 5. Espectro UV de PgAF.



**Anexo 6.** Cromatograma HPLC del extracto PgMETOH.*Palicourea guianensis***PgMETOH****I.****II.****III.****IV.****V.**



VI.

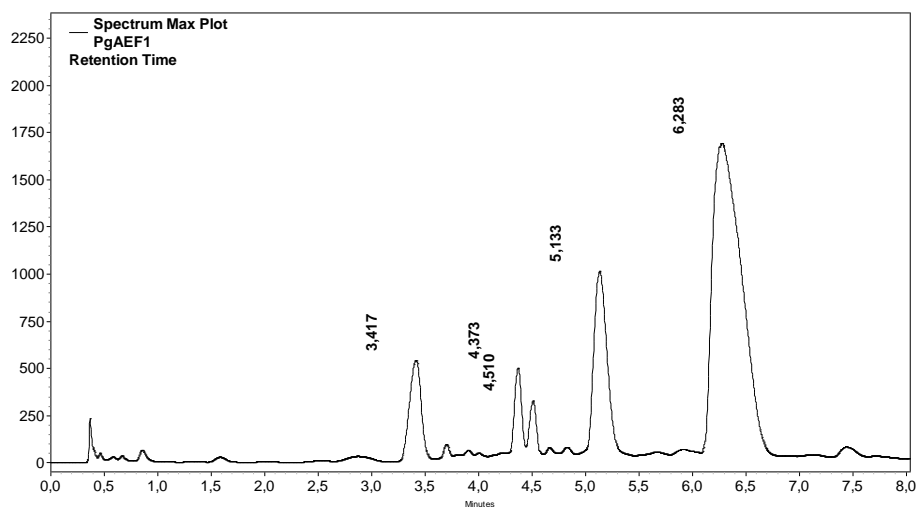


Anexo 7. Cromatograma HPLC del extracto PgAEF.

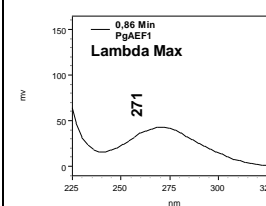
Palicourea guianensis

PgAEF

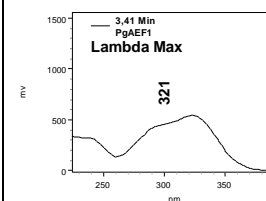
I.



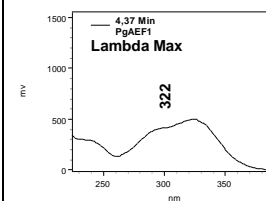
II.

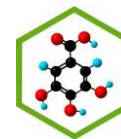


III.

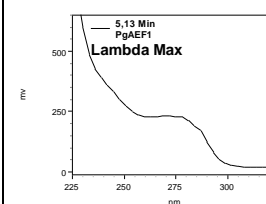


IV.

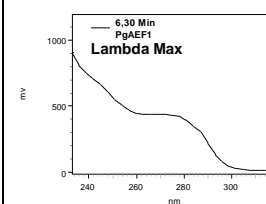




V.



VI.

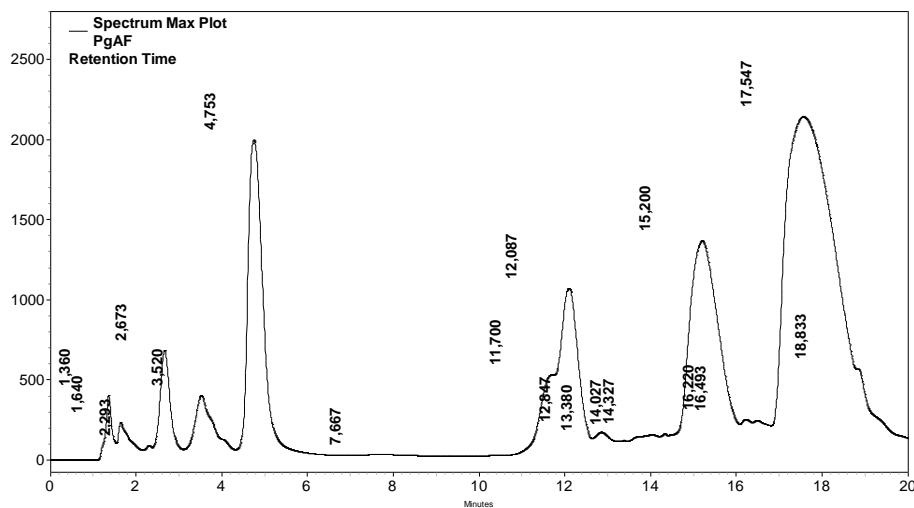


Anexo 8. Cromatograma HPLC del extracto PgAF.

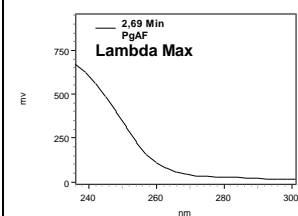
Palicourea guianensis

PgAF

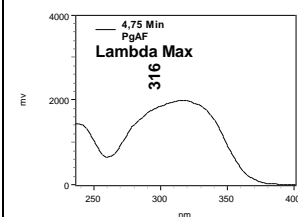
I.

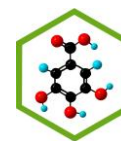


II.

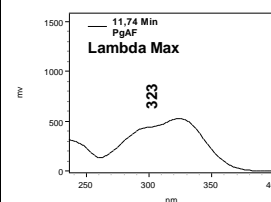


III.

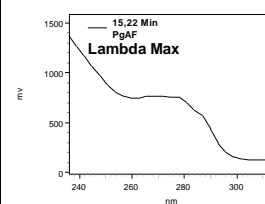




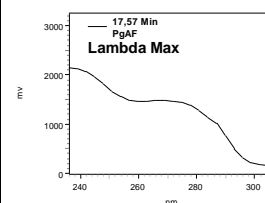
IV.



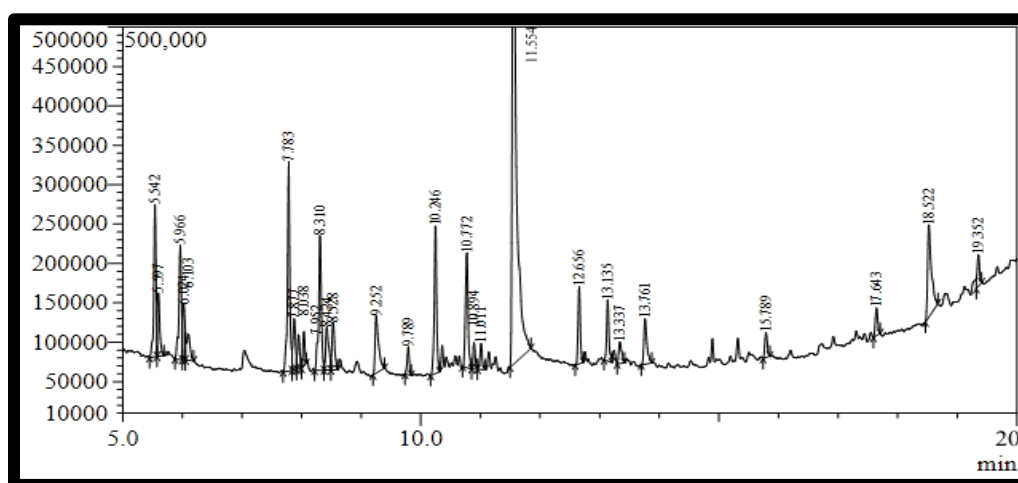
V.

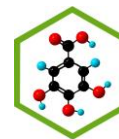


VI.

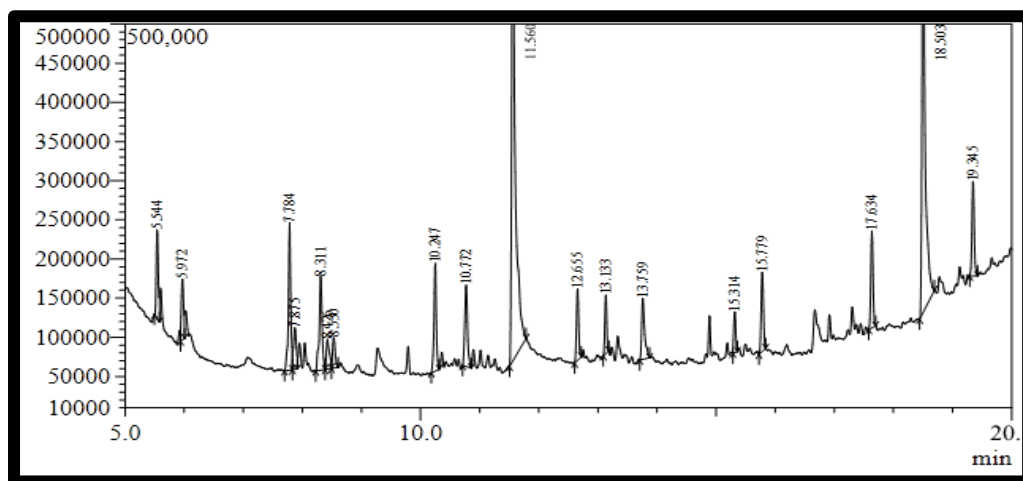


Anexo 9. Cromatograma GC del extraco PgHF.



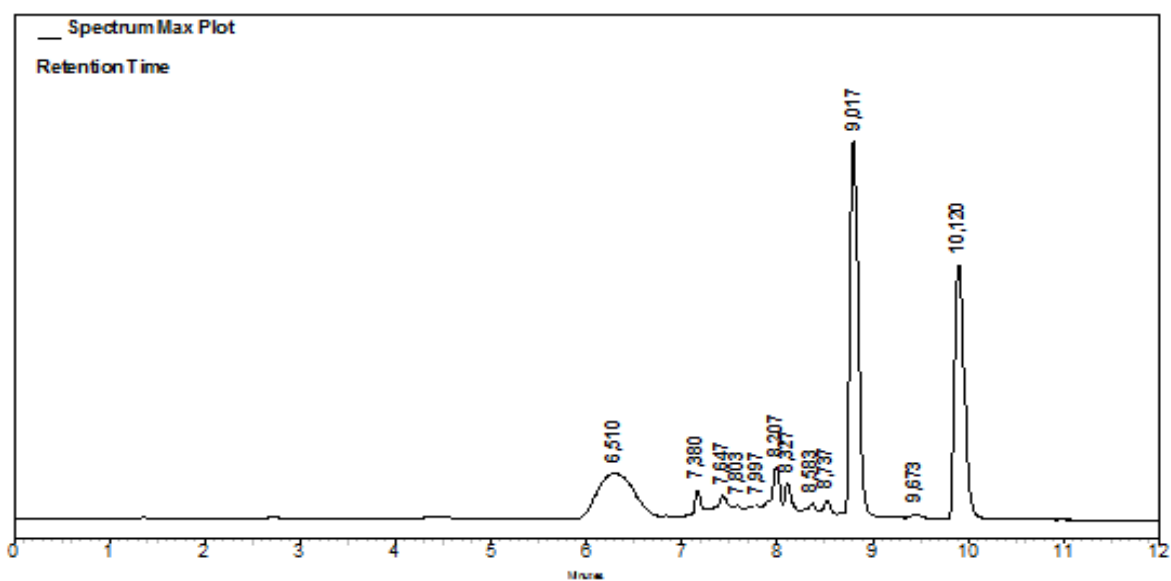


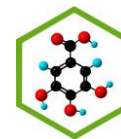
Anexo 10. Cromatograma GC del extracto PgDF.



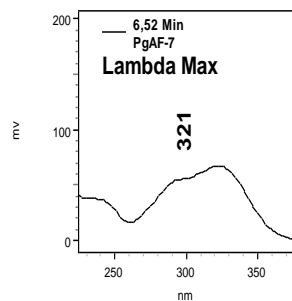
Anexo 11. I. Cromatograma fracciones PgAF-6+7, II. UV (TR 6,52 min), III. UV (TR 7,34 min), IV. UV (TR 8,16 min), V. UV (TR 8,35 min), VI. UV (TR 8,96 min), VII. UV (TR 9,02 min), VIII. UV (TR 10,12 min).

I.

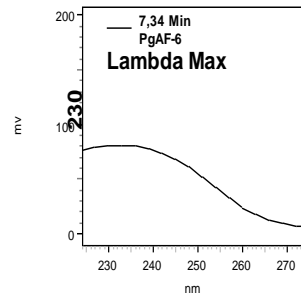




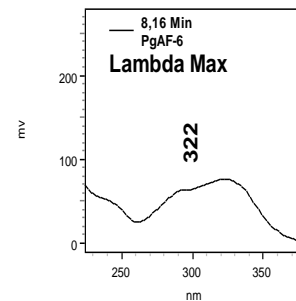
II.



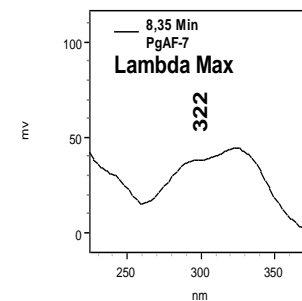
III.



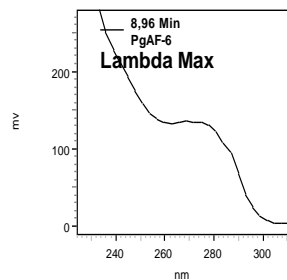
IV.



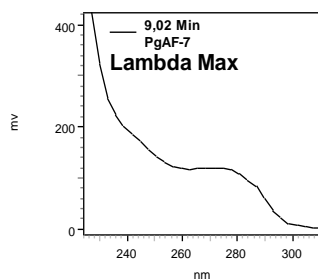
V.



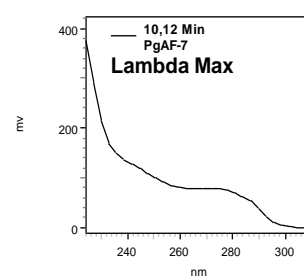
VI.



VII.

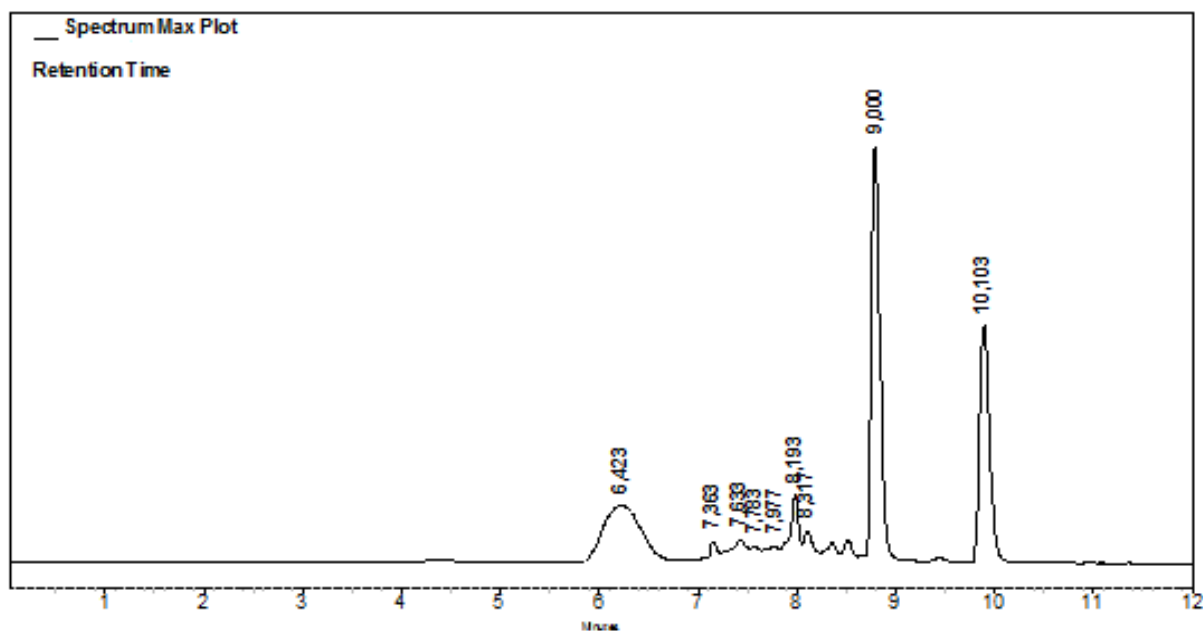


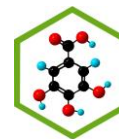
VIII.



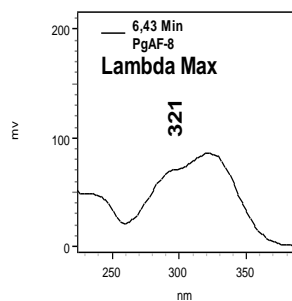
Anexo 12. I. Cromatograma PgAF-8, II. UV (TR 6,43 min), III. UV (TR 7,63 min), IV. UV (TR 8,20 min), V. UV (TR 9,00 min).

I.

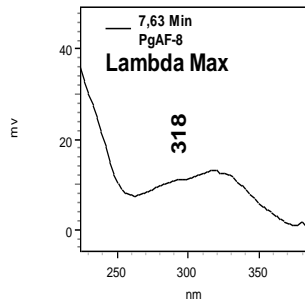




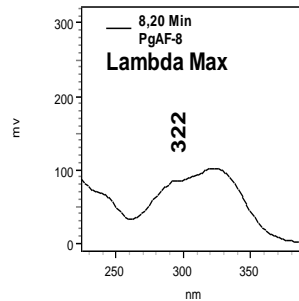
II.



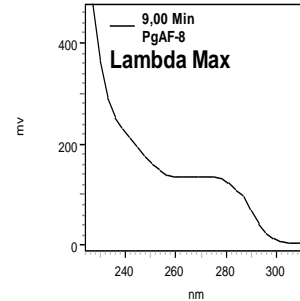
III.



IV.

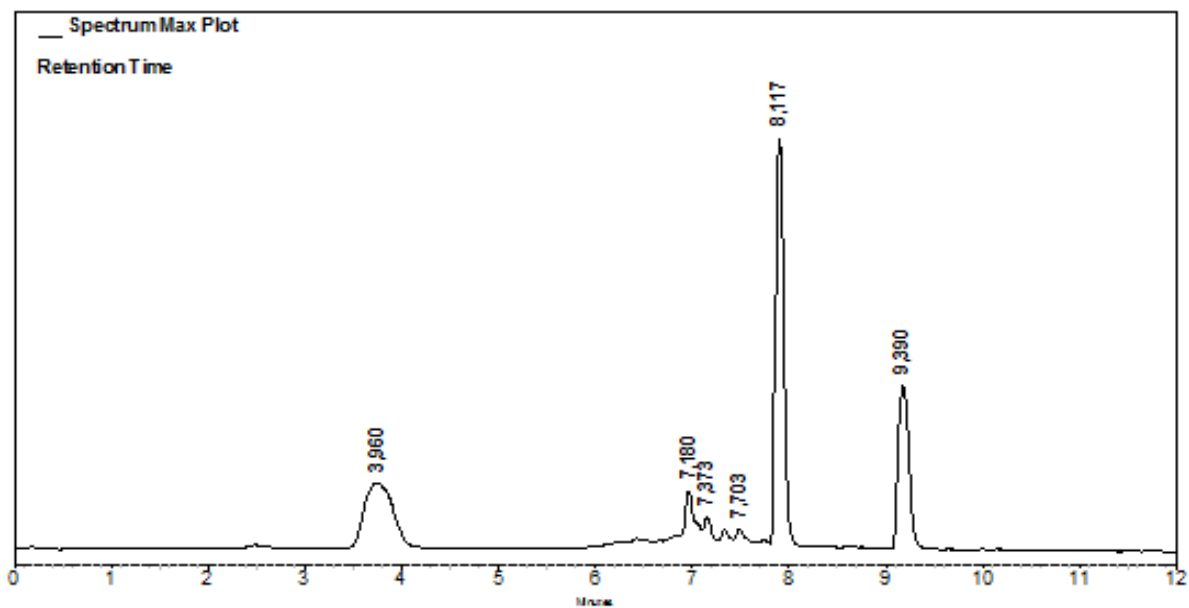


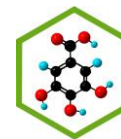
V.



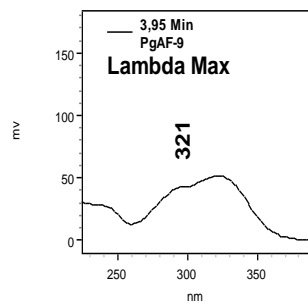
Anexo 13. I. Cromatograma PgAF-9, II. UV (TR 3,95 min), III. UV (TR 7,19 min), IV. UV (TR 8,11 min) VIII. UV (TR 9,39 min).

I.

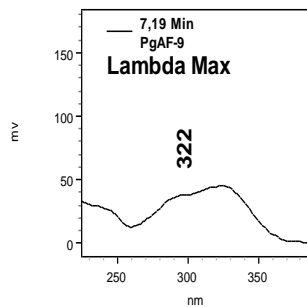




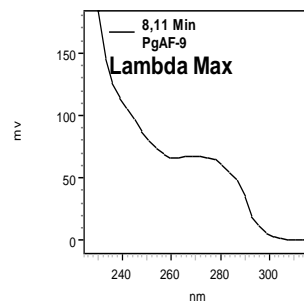
II.



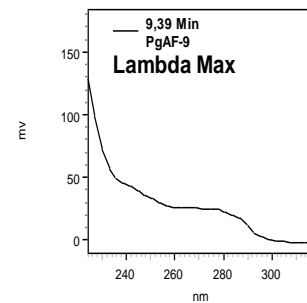
III.



IV.

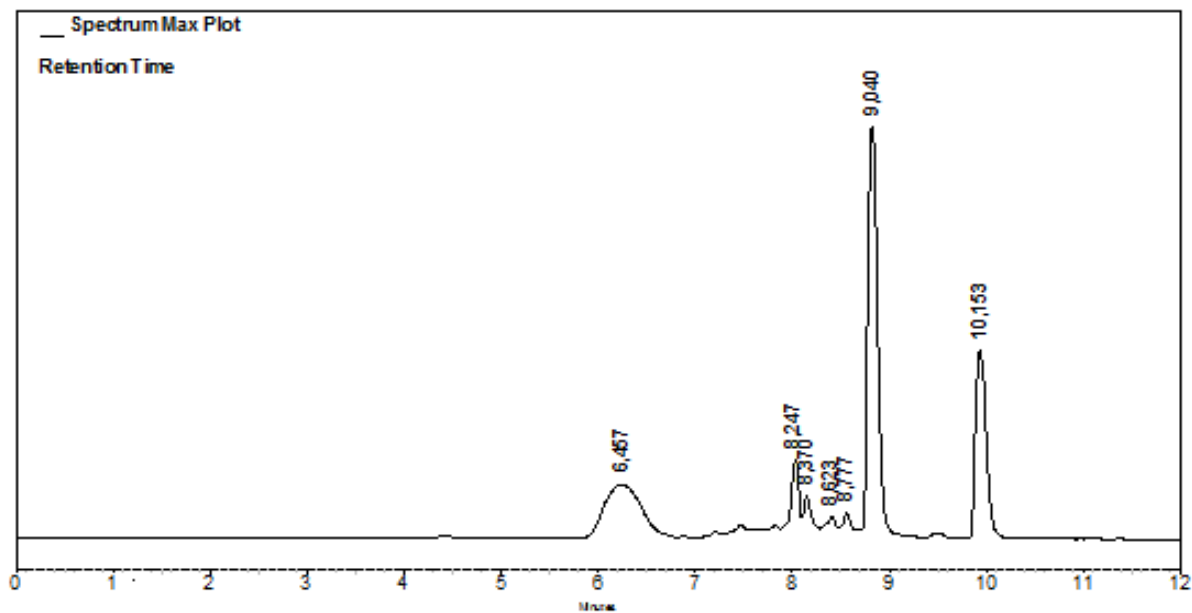


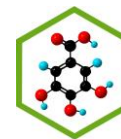
V.



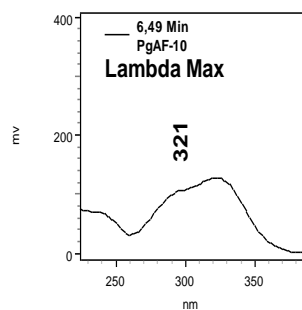
Anexo 14. I. Cromatograma fracciones PgAF-10-13, II. UV (TR 6,49 min), III. UV (TR 8,25 min), IV. UV (TR 8,70 min), V. UV (TR 8,79 min), VI. UV (TR 9,04 min).

I.

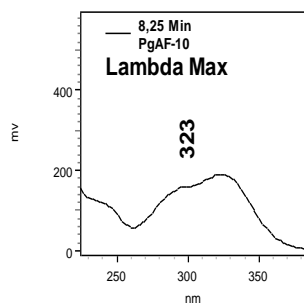




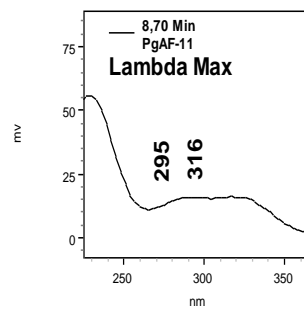
II.



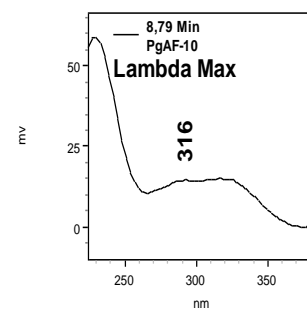
III.



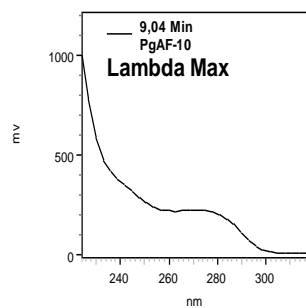
IV.



V.

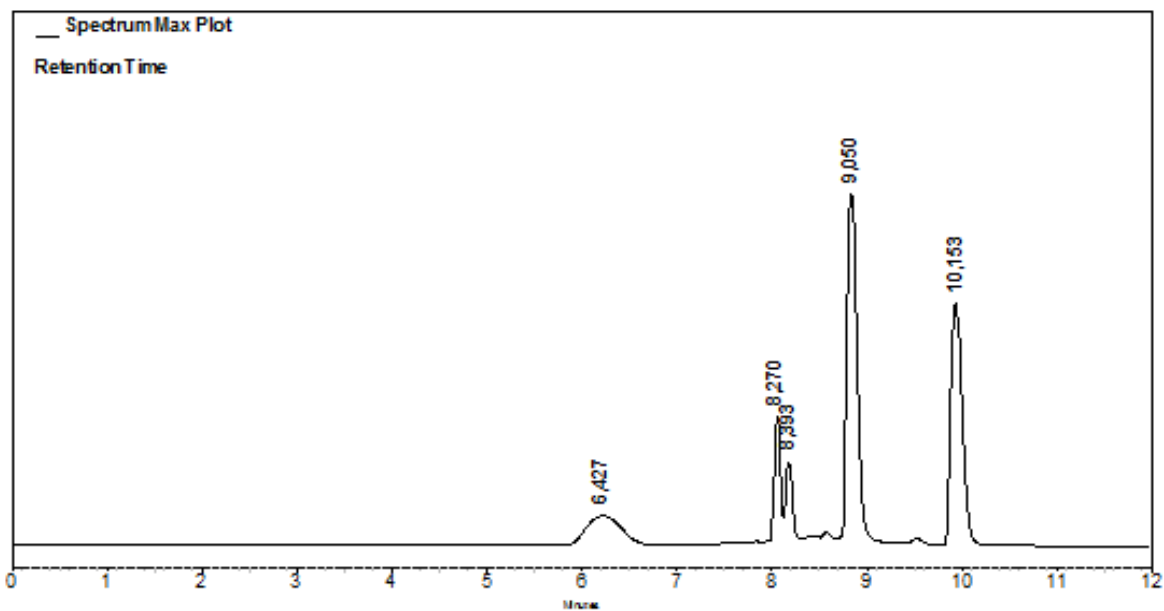


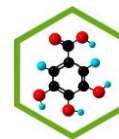
VI.



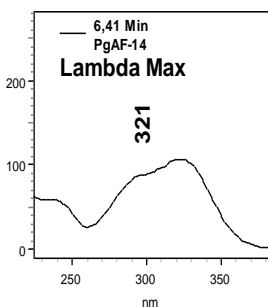
Anexo 15. I. Cromatograma fracciones PgAF-14+15, II. UV (TR 6,41 min), III. UV (TR 8,27 min), IV. UV (TR 8,39 min), V. UV (TR 9,05 min).

I.

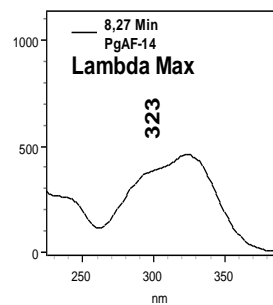




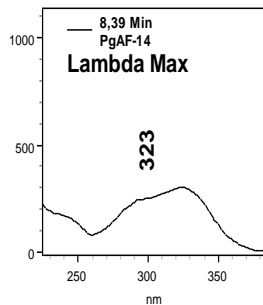
II.



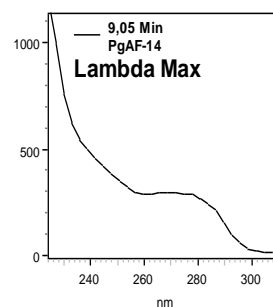
III.



IV.

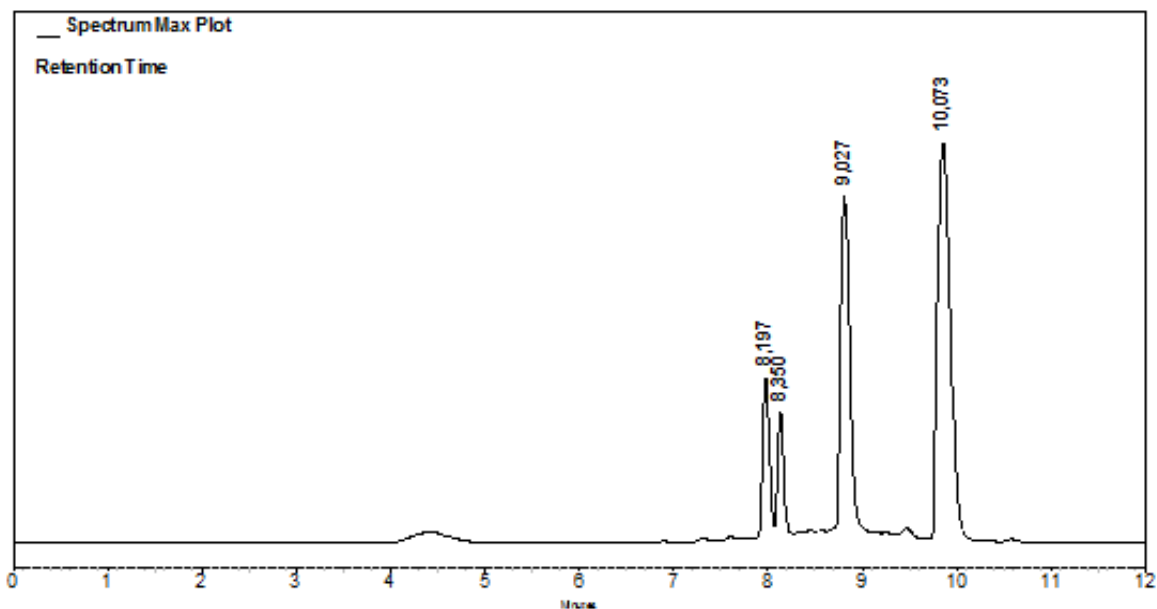


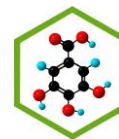
V.



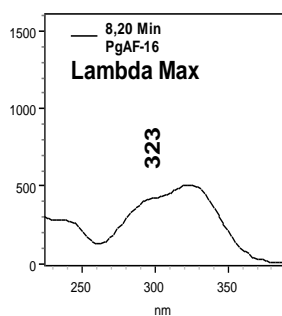
Anexo 16. I. Cromatograma Fracciones PgAF-16+17, II. UV (TR 8,20 min), III. Uv (TR 8,35 min), IV. UV (TR 9,03 min), V. UV (TR 10,07 min).

I.

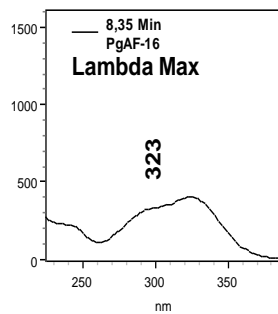




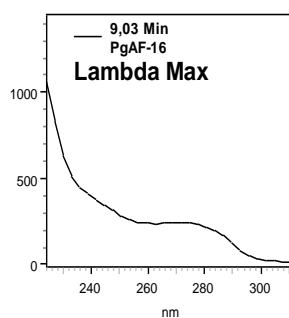
II.



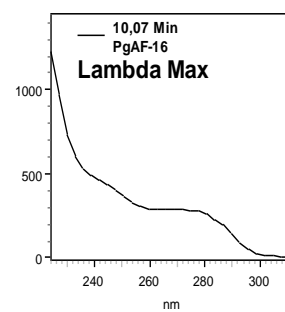
III.



IV.

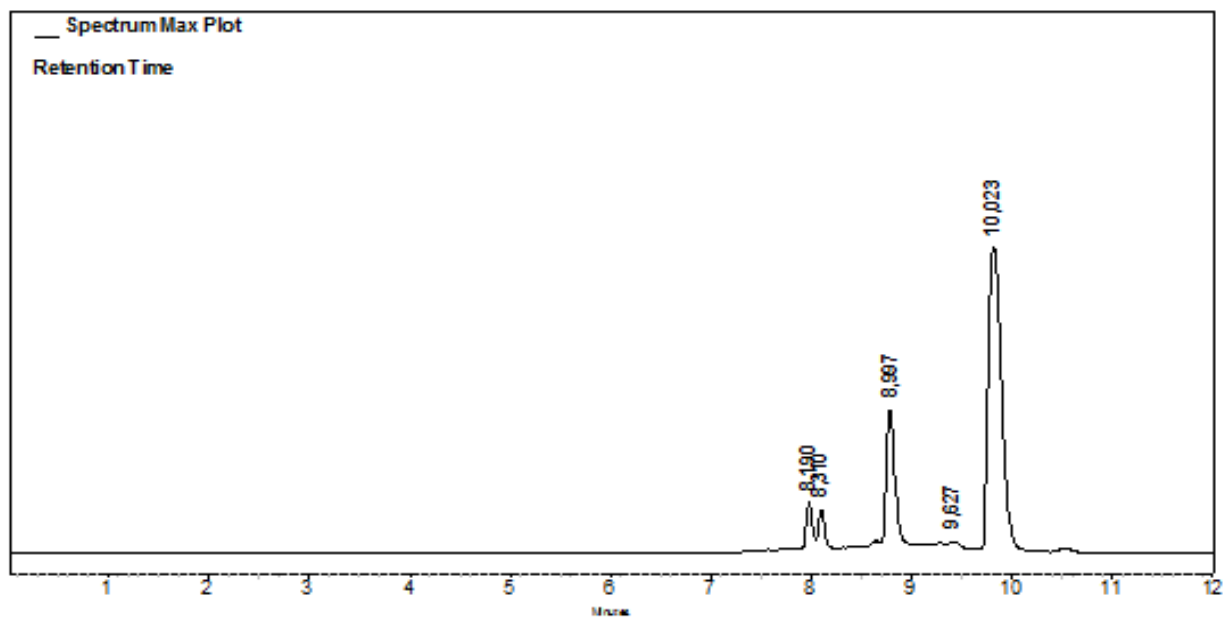


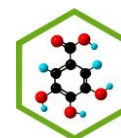
V.



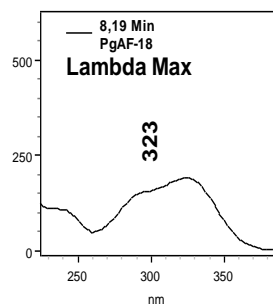
Anexo 17. I. Cromatograma PgAF-18, II. UV (TR 8,19 min), III. UV (TR 8,31 min), IV. UV (TR 9,00 min), V. UV (TR 10,03 min).

I.

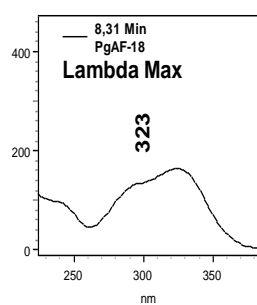




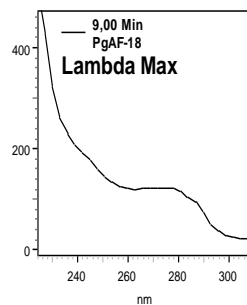
II.



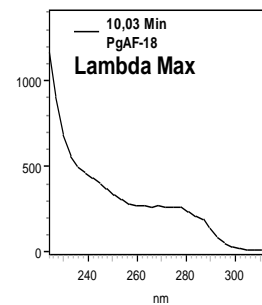
III.



IV.

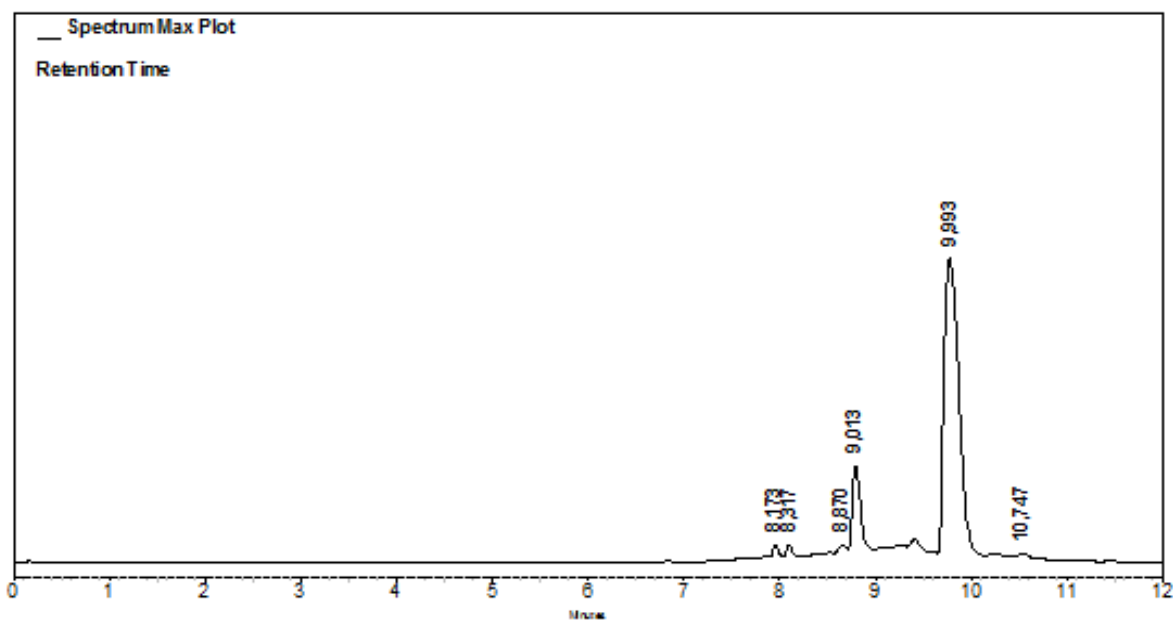


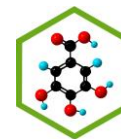
V.



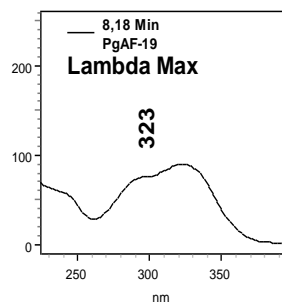
Anexo 18. I. Cromatograma PgAF-19, II. UV (TR 8,18 min), III. UV (TR 8,32 min), IV. UV (TR 9,01 min), V. UV (TR 10,00 min).

I.

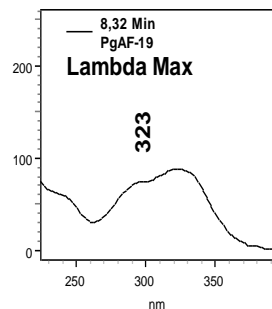




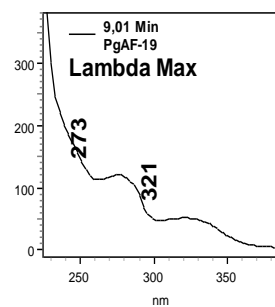
II.



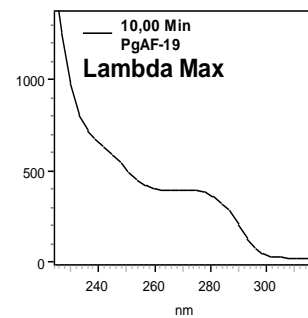
III.



IV.

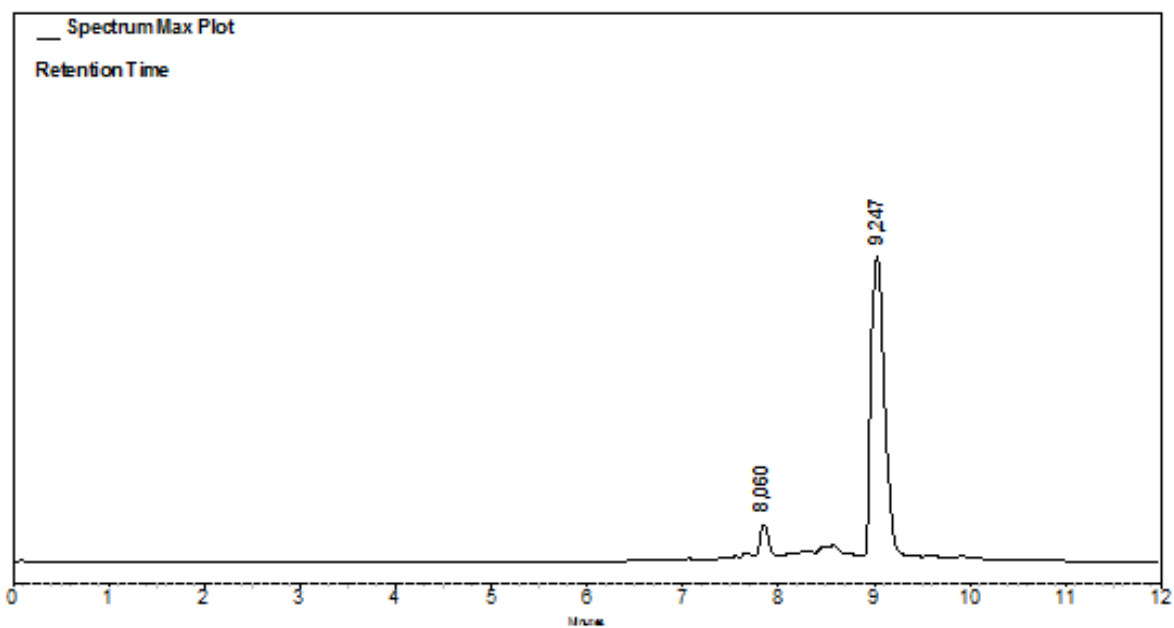


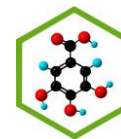
V.



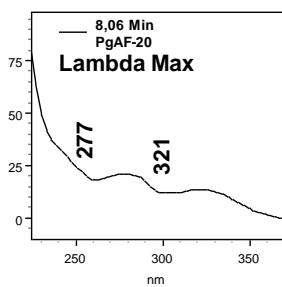
Anexo 19. I. Cromatograma PgAF-20, II. UV (TR 8,06 min), III. UV (TR 9,25 min).

I.

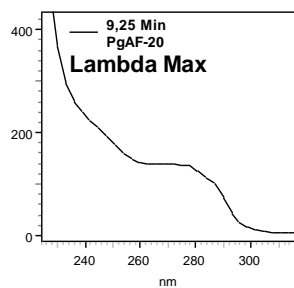




II.

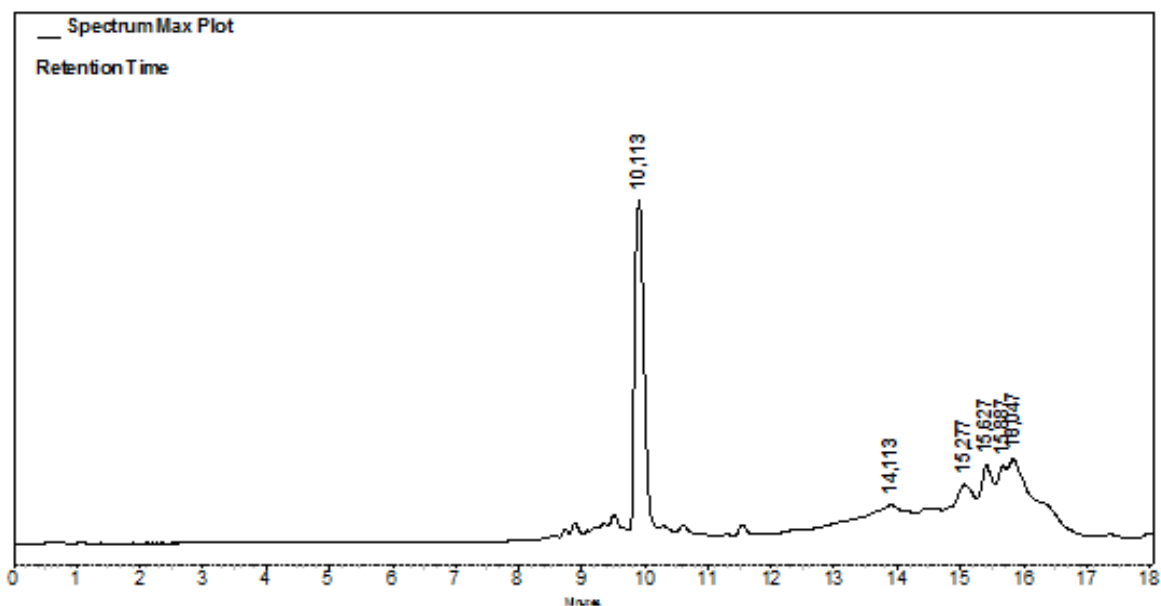


III.

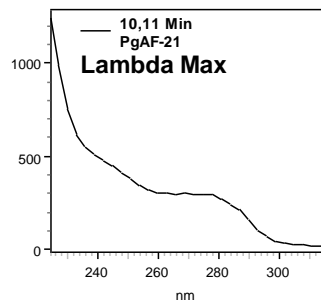


Anexo 20. I.Cromatograma PgAF-21, II. UV (TR 10,11 min), III. UV (TR 15,31 min).

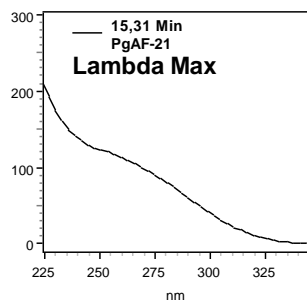
I.

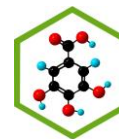


II.



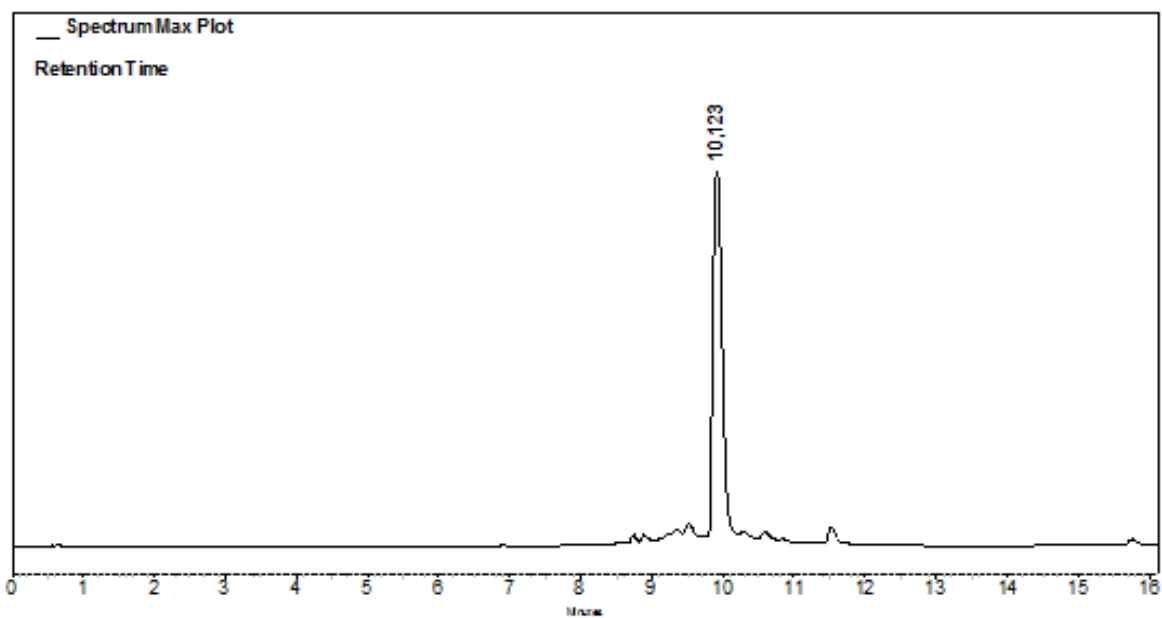
III.



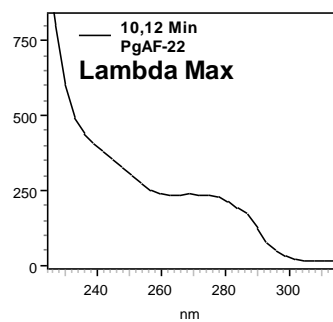


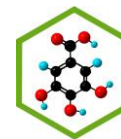
Anexo 21. I. Cromatograma fracciones PgAF-22-27, II. UV (TR 10,12 min).

I.



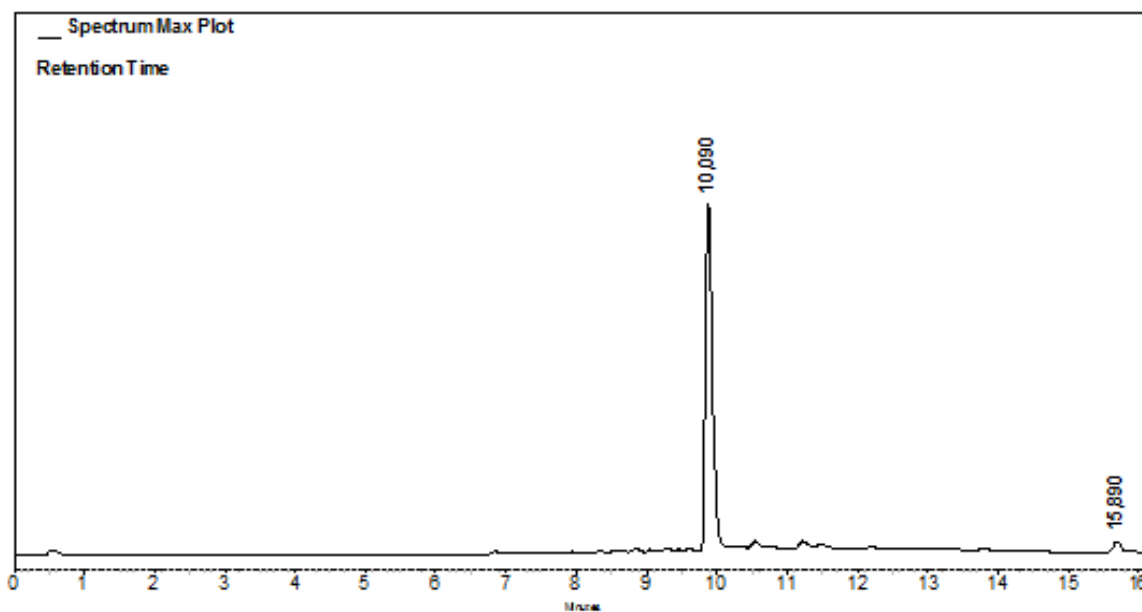
II.



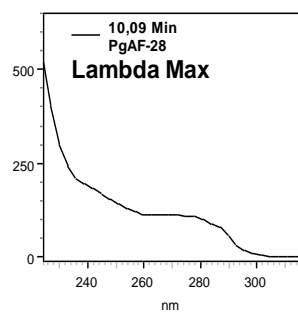


Anexo 22. I. Cromatograma PgAF-28, II. UV (TR 10,09 min), III. UV (TR 15,90 min).

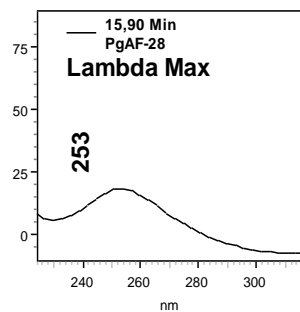
I.

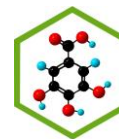


II.



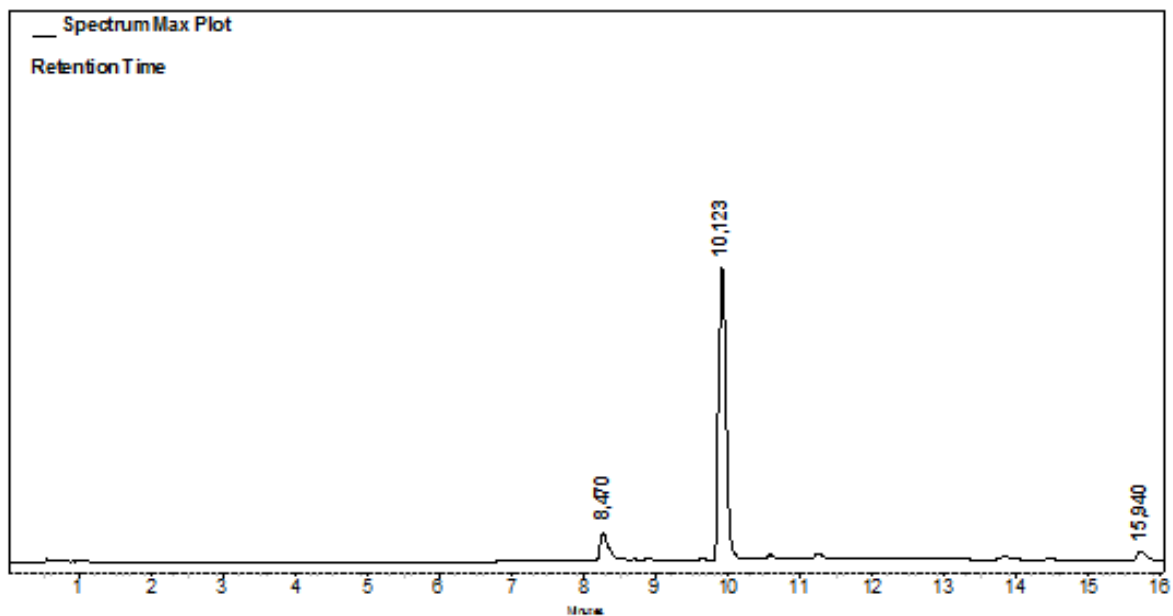
III.



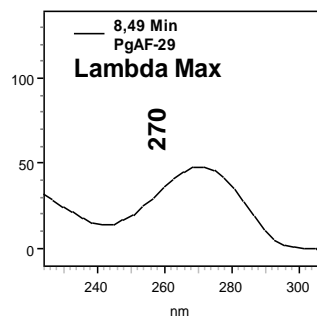


Anexo 23. I. Cromatograma PgAF-29, II. UV (TR 8,49 min), III. UV (TR 10,12 min), IV. UV (TR 15,97 min).

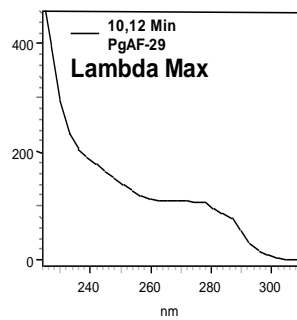
I.



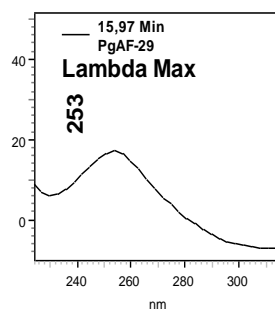
II.

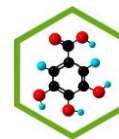


III.



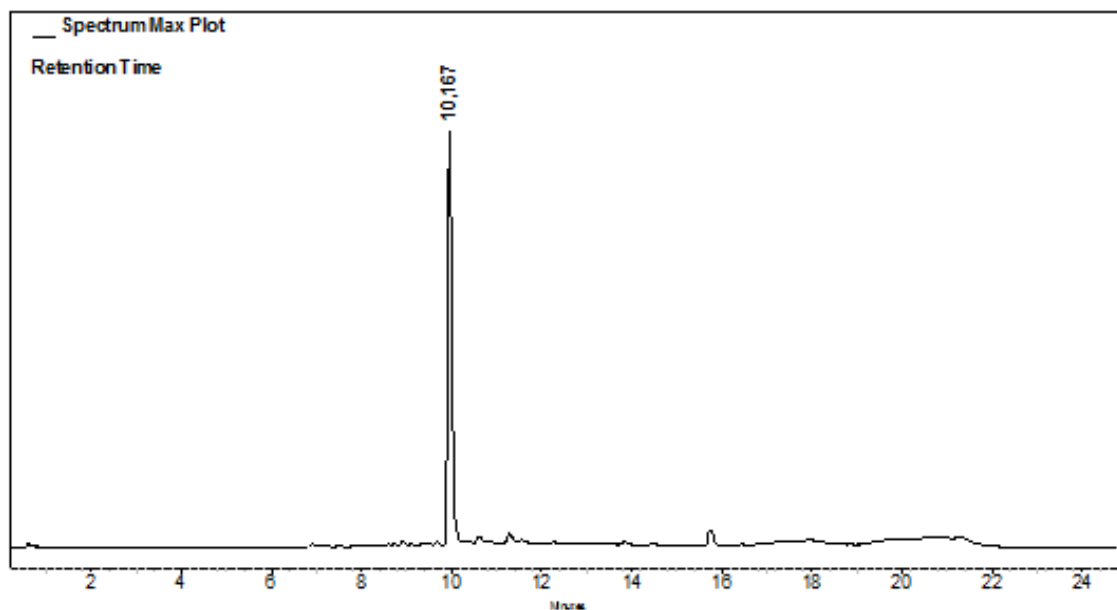
IV.



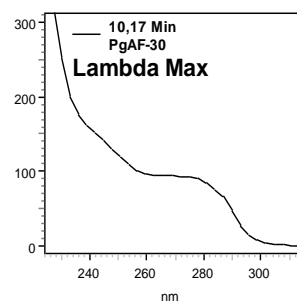


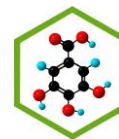
Anexo 24. I. Cromatograma PgAF-30+31, II. UV (TR 10,17 min).

I.



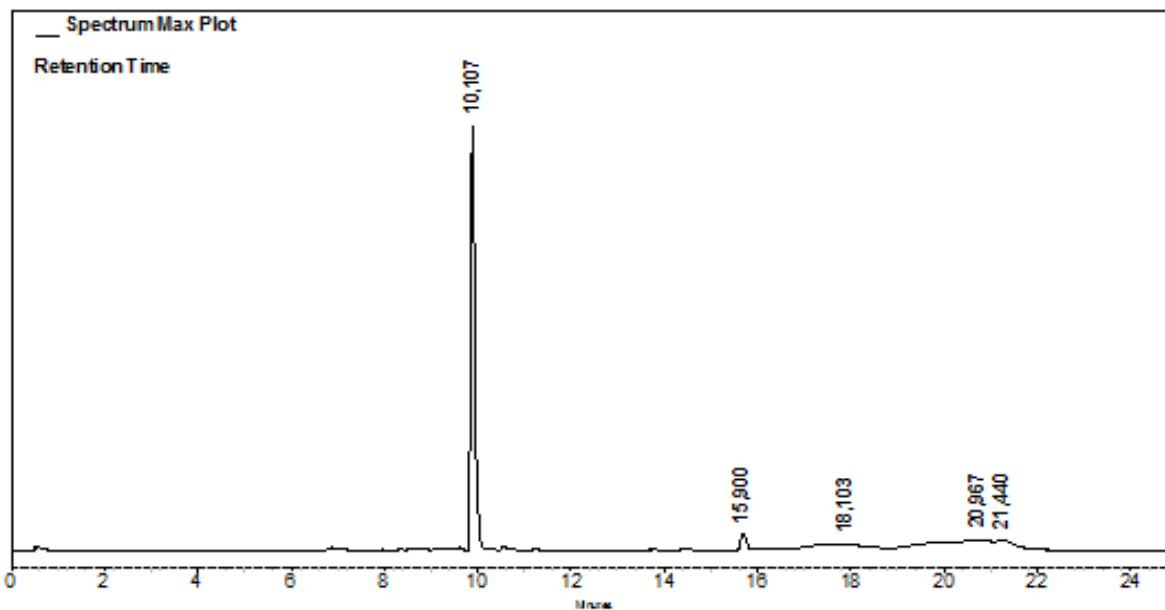
II.



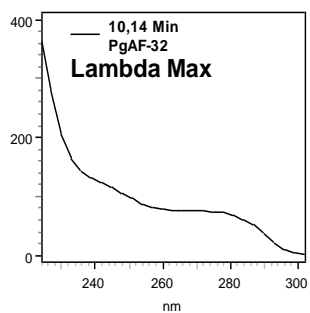


Anexo 25. I. Cromatograma PgAF-32-34, II. UV (TR 10,14 min), III. UV (15,89 min), IV. (TR 14,86 min).

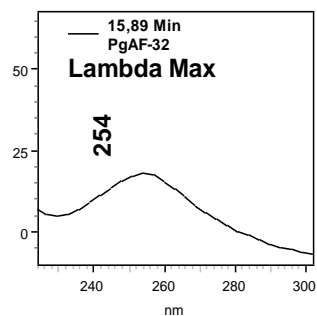
I.



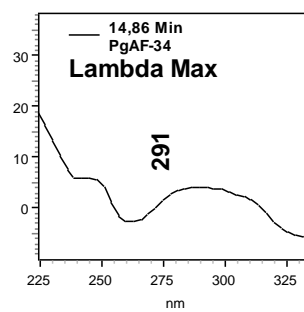
II.

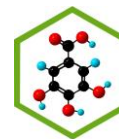


III.



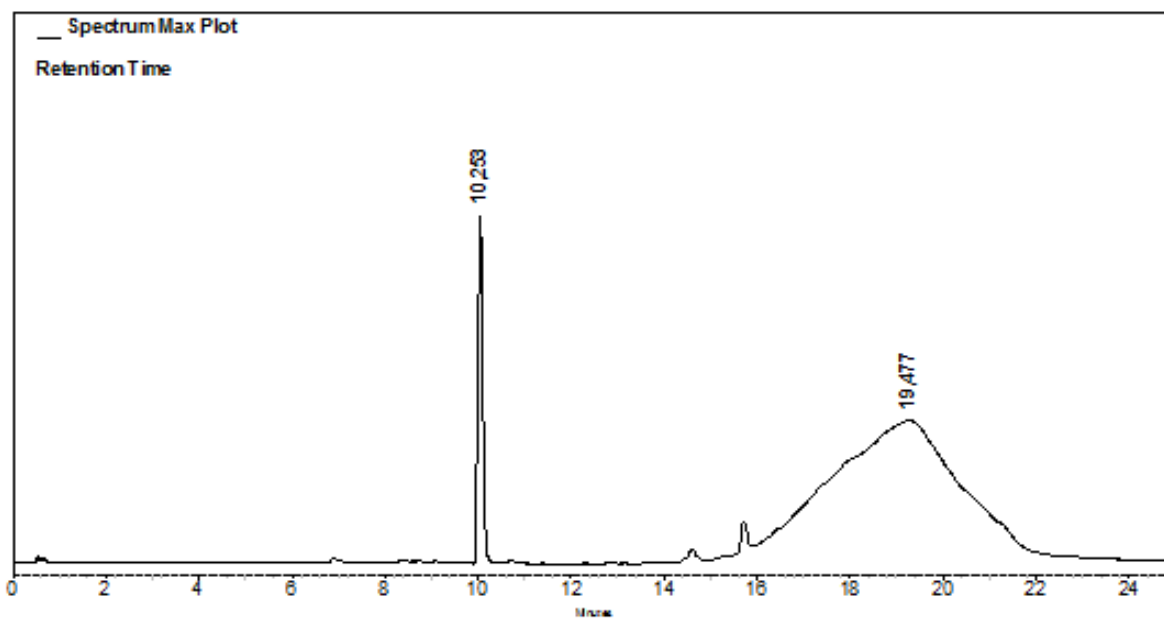
IV.



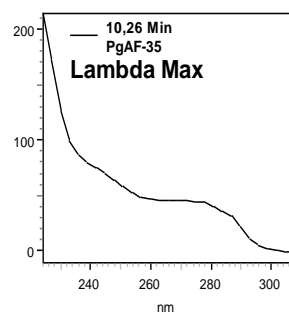


Anexo 26. Cromatograma PgAF-35, II. UV (TR 10,26 min), III. UV (TR 15,93 min).

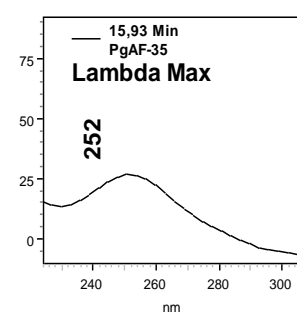
I.

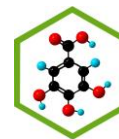


II.



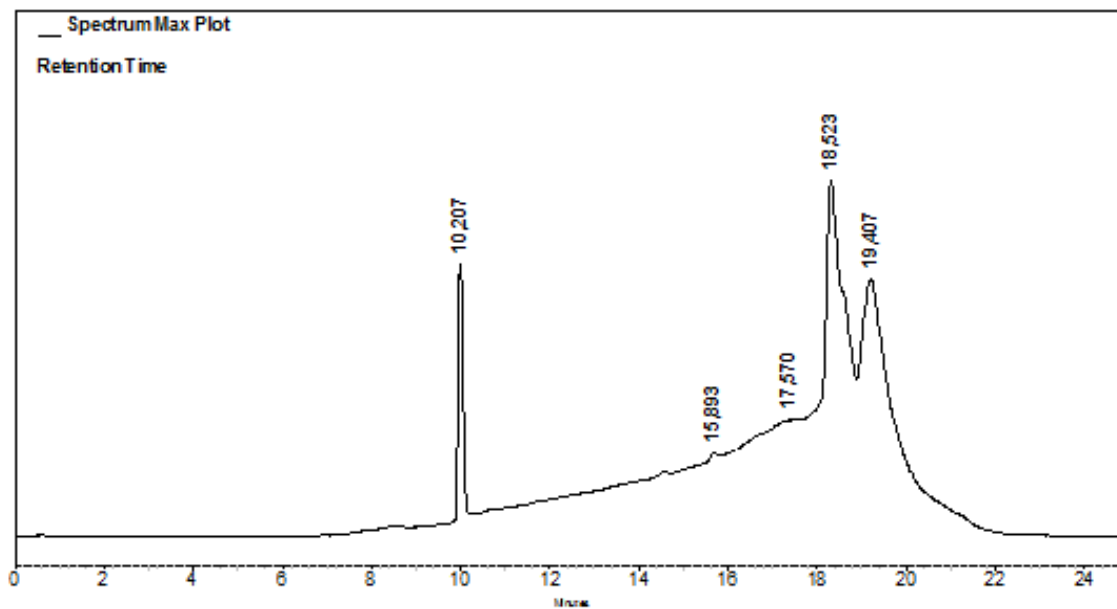
III.



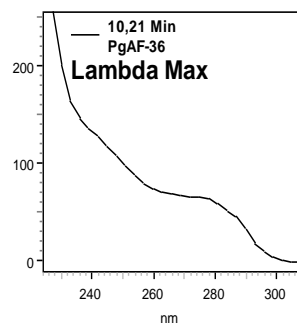


Anexo 27. I. Cromatograma PgAF-36-44, II. UV (TR 10,21 min), III. UV (TR 18,53 min), IV. UV (TR 19,42 min).

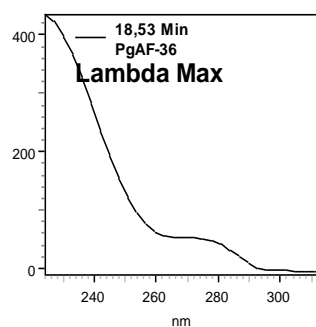
I.



II.



III.



IV.

